DIE CHEMISCHEN VORGÄNGE IM SAUROMATUM-KOLBEN

von

A. W. H. VAN HERK.

I. DIE FRAGESTELLUNG.

§ 1. Die „Eigenwärme" der Araceen.

Es ist eine längst bekannte Erscheinung, dass nur bei wenigen Pflanzen unter normalen Verhältnissen eine nennenswerte, durch die Lebensvorgänge bedingte Erhöhung der Körpertemperatur über die der Umgebung festzustellen ist. Eine grosse Eigenwärme ist ausschliesslich in Blütenständen und Einzelblüten gemessen worden, wie in den Infloreszenzen von Palmen und Cycadeen, in Karpell-Anhängseln von Victoria Regia Blüten, u.a. Besonders hohe Blütentemperaturen beobachtet man bei den Araceen. Leick (83) gibt eine Aufzählung der Fälle, in denen eine messbare Eigenwärme beobachtet werden konnte.

Diese Erscheinung ist öfters ausführlich untersucht worden. Auf die vorliegenden Versuchsergebnisse gehe ich nur in beschränktem Masse ein, zumal da Leick (82, 84) und Rodio (102) diesbezügliche Übersichten bereits gegeben haben. Vor allem beschäftigte man sich mit den Fragen nach dem Verlauf der Wärme-Entwicklung während der Blüten-Entfaltung, — ob es ein oder mehrere Maxima gibt und wie es steht mit ihrer Abhängigkeit von den Aussenbedingungen —, nach dem Ort der Wärmebildung und nach der biologischen Bedeutung des Phänomens.

Dass die Erhöhung der Blütentemperatur die Folge einer energischen Atmung ist, wurde schon früh anerkannt. Die Aufnahme von Sauerstoff, die Ausscheidung von Kohlensäure und die überraschend schnelle Abnahme der Kohlehydratmenge während dieses Vorganges wurden in den Arbeiten von Garreau (40), Eriksson (13), Kraus (63, 64, 65) und viele anderen, nachgewiesen. Die Intensität der Atmung schwankt genau so wie die Erwärmung: sie steigt plötzlich stark und nimmt ebenso schnell wieder ab. Jede Temperaturerhöhung bleibt aus, wenn man die Luft durch Stickstoff, Wasserstoff oder Kohlensäure verdrängt.

Bemerkenswert ist, dass der ganze Vorgang nur in den ausgewachsenen Teilen der Blüten und Infloreszenzen nachweisbar ist.

Wir wollen uns hier näher beschäftigen mit den Araceen, da die Mehrzahl der Untersuchungen eben mit dieser Pflanzenfamilie ausgeführt worden sind. Die Erwärmungskurven zeigen bei jeder Species eine mehr oder weniger charakteristische Periodizität. Sie können, bei den nicht mit einem nackten Appendix versehenen Araceen, eine tägliche Periodizität aufweisen, mit im Ganzen zwei bis fünf Maxima (Colocasia). Bei den Araceen mit nackten Appendices (Sauromatum und Arum-Arten) tritt nur ein Maximum auf; hier beobachtet man die höchsten Temperaturen.

Nach KRAUS (64) enthält die Keule von Arum italicum 77,8% ihrer Trockensubstanz an Kohlenhydraten (Stärke und Zucker), die in wenigen Stunden verschwinden. Die vom Anfang an in der Keule vorhandenen Pflanzensäuren vermehren sich bei der Erwärmung ansehnlich; die stickstoffhaltigen Körper werden nicht angegriffen. KNOCH (61) betont mit Recht, dass diese letzte Schlussfolgerung von KRAUS nicht erwiesen ist, da seine Versuche mit zu geringen Materialmengen und ohne die erforderlichen Kontrollmessungen ausgeführt wurden. Allerdings hat er selbst die Mengen der stickstoffhaltigen Substanzen nicht bestimmt.

SANDERS (105) berichtet über Bestimmungen des respiratorischen Quotienten bei Arum maculatum und Dracunculus vulgaris. Vor der Erwärmung ist dieser Wert 1 bis 1,2; gleich nach der Atmungserniedrigung wird er kleiner und ist grossen Schwankungen unterworfen.

Über die an dieser Reaktion beteiligten Fermente ist fast nichts bekannt. Ob sie nur Kohlehydraten und keine anderen Körper oxydieren, ist nicht eingehend untersucht worden; ebensowenig ob sie diese Substanzen vollständig verbrennen.

Der Presssaft von Arum maculatum enthält eine Invertase und ein proteolytisches Enzym, die nicht genau untersucht worden sind. HAHN (42) berichtet über einen interessanten Versuch: im Presssaft befindet sich ein Enzymsystem, das sowohl aerob wie anaerob Zucker zum Verschwinden bringt unter Bildung von Kohlensäure und von einer anderen (unbekannten) Säure. Nach WEEVERS (149) gelingt es aus Sauromatum ein Enzymdauerpräparat durch Alkoholfällung zu erhalten, das Glucose in Kohlensäure und Citronensäure spaltet. SCHMUCKER (107) erwähnt, dass der Presssaft von Arum eine stark wirksame Diastase enthält mit pH-Optimum 5,0. Ihre Wirkung soll durch Blausäure stark beeinträchtigt und durch $MnSO_4$ kräftig befördert werden. Vor der Entfaltung der Knospen ist nur ein schwach wirksames Präparat zu isolieren. Weiter berichtet SCHMUCKER über das Vorkommen von Katalase. Das Enzym ist von BADENHUIZEN und mir (46) in reiner Form isoliert worden. Das von uns erhaltene Präparat weicht in wesentlichen Punkten von den Angaben Schmuckers ab.

Die Versuche, auf direktem Wege aus dem wässrigen Auszug der Kolben oder auf dem Umwege über Alkoholfällung oder Glycerinauszug zu einem haltbaren, aktiven Dauerpräparat der Atmungsenzyme zu gelangen, sind bisher, abgesehen von den Versuchen von WEEVERS, gescheitert.

Der Einfluss von Narkotika auf die Atmung wurde von SCHMUCKER untersucht. Während Chloroform die Verbrennung weitgehend hindert,

hat Aether eine wesentlich schwachere Wirkung. VAN HERK und BADENHUIZEN untersuchten die Atmungshemmungen mit Blausäure, Kohlenoxyd und Urethan (46).

§ 2. Die Fragestellung.

Unsere Kenntnis über den Atmungsmechanismus verdanken wir vorzugsweise zwei Untersuchungsmethoden: der einen, die gestattet durch die Einwirkung spezifisch wirkender Gifte, Teilreaktionen der Atmung auszuschalten und so nähere Aufschlüsse zu erhalten über die Natur der an diesen Teilreaktionen beschäftigten Enzymsysteme, und der anderen, die darin besteht, den Zusammenhang des Verbrennungsmaterials und der gebildeten Reaktionsprodukte zu untersuchen und wenn möglich, nähere Einsicht zu erhalten über die Zwischenprodukte. Die letzterwähnte Methode bietet ins besondere der Erforschung der Kohlehydrat-Veratmung grosse Schwierigkeiten dar, da die Verbrennung fast immer zu Kohlensäure und Wasser fortschreitet und die Zwischenprodukte mit grosser Geschwindigkeit weiter oxydiert werden.

Es würde einen Schritt weiter zur vollständigen Aufklärung der Atmungsvorgänge führen, wenn eine dritte Arbeitsmethode anwendung finden könnte und es gelingen würde, die für die Atmung verantwortlichen Enzymkomplexe in ihren Komponenten zu zerlegen, diese in ihrer spezifischen Reaktionsweise kennen zu lernen und zuletzt aus den isolierten Komponenten wieder den komplizierten Mechanismus zu erhalten. Auch in dieser Richtung waren in den letzten Jahren bemerkenswerte Erfolge zu verzeichnen.

Solche Enzymtrennungen bereiten im Falle der Atmungsenzyme im allgemeinen erhebliche Schwierigkeiten. Diese sind nicht nur der Unbeständigkeit dieser Fermente zuzuschreiben, sondern auch einer stark ausgeprägten Spezifität in Bezug auf Substrat und Wasserstoffacceptor.

In dieser Untersuchung habe ich, unter Anwendung der beiden zuletzterwähnten Arbeitsmethoden, die folgenden Fragen zu beantworten versucht:

1. Welche Substanzen werden im Appendix der Sauromatum-Kolben veratmet? Ist deren Verbrennung vollständig, oder kann man eine Anhäufung gewisser Zwischenprodukte nachweisen?
2. Gelingt es Enzyme zu isolieren, die wir als wesentliche Bestandteile des Atmungssystems betrachten dürfen und können wir ihre Wirkungen näher untersuchen?
3. Welche Faktore bedingen die plötzliche Erhöhung und die darauffolgende Erniedrigung der Atmungsintensität?

Auch war eine nähere Untersuchung des Atmungsverlaufs notwendig, da nur wenige Angaben darüber vorliegen.

Es ist also die Aufgabe, den Atmungsvorgang im Sauromatum-Appendix in biochemischer Hinsicht zu analysieren. Eben wegen der Erscheinung des Atmungswechsels scheint er ein besonders geeignetes Objekt zu sein um diesen Vorgang zu untersuchen.

Man beobachtet zwar öfters weit höhere Atmungswerte, doch diese ändern sich meistens nicht, die Anwesenheit genügender Mengen Verbrennungsmaterials vorausgesetzt. Und in den Fällen, in denen sie nicht konstant sind, beruhen die Änderungen auf besondere Erscheinungen. So die ausserordentlich starke Atmungserhöhung, die bei der Befruchtung bemerkbar ist (z.B. in Seeigeleiern, 133, 103, 44). Hier treten starke morphologische und cytologische Änderungen auf, verbunden mit einer grossen Zellteilungsgeschwindigkeit.

Beim Sauromatum-Appendix liegen günstige Verhältnisse vor: während der Wachstumsperiode ist die Atmungsintensität gering: sie wird in wenigen Stunden stark erhöht, jedoch hat das Organ dann seine maximale Entwicklung schon erreicht und ist von morphologischen Änderungen, anders als durch die Eigenwärme bedingt, nichts zu bemerken.

Wir dürfen nicht annehmen, dass die Atmung aller pflanzlichen Zellen sich nach demselben Prinzip vollzieht; der oxydative Abbau einer Substanz wird in verschiedenen Pflanzen, — sogar vielleicht in verschiedenen Organen eines Individuums —, nicht immer vom selben Fermentsystem verursacht. Es ist also nicht erlaubt, die in dieser Untersuchung erhaltenen Resultate auf andere Pflanzen zu übertragen.

Ich möchte hier bemerken, dass es bis jetzt nicht möglich war, die gestellte Aufgabe erschöpfend zu erforschen; ich betrachte diese Arbeit nur als einen weiteren Versuch zur Lösung des Problems. Wie günstig das Material für die Erforschung der Atmungsvorgänge auch sein mag, die Untersuchung ist vielfach lückenhaft geblieben, da es schwierig war genügende Materialmengen zu erhalten und weil die Blütenperiode so kurz ist.

Im ganzen konnte ich für diese Untersuchung über etwa 160 blühenden Sauromatum-Pflanzen verfügen. Sie wurden im botanischen Garten gezüchtet.

II. DIE DEHYDRASEN UND DAS FLAVINENZYM.

§ 3. Über die Wirkung einiger Dehydrase-Systeme.

Ich musste mich in dieser Untersuchung auf die Erforschung weniger Enzymsysteme beschränken. Es sei damit nicht gemeint,

dass andere Systeme von keiner Bedeutung wären. Ich erwähne in folgender Übersicht nur die Arbeiten, die im engen Zusammenhang mit dem untersuchten Gebiet stehen.

Bei der Atmung der lebenden Zelle reagiert der Luftsauerstoff nicht unmittelbar mit dem Verbrennungsmaterial. Die Reaktion wird erst durch die Mitwirkung einer Serie von Katalysatoren ermöglicht. In Bezug auf ihrer Wirkung können wir diese Fermente in zwei grossen Systemen zusammenstellen: entweder aktivieren sie den Nährstoff, lösen dessen Wasserstoffatome ab und übertragen diese dem Sauerstoff, oder aber sie aktivieren den molekularen Sauerstoff, der in dieser Form mit dem Substrat reagieren könnte (148). Vielleicht wirken beide Systeme bei der Atmung zusammen unter Mitwirkung von Zwischenkatalysatoren.

Die in der zuerstgenannten Weise wirkenden Fermente hat man als Dehydrasen bezeichnet. Sie zeigen grosse spezifische Differenzen auf. Man kann zwei Gruppen von Dehydrasen unterscheiden: diejenige, an welcher Wirkung ein Co-Ferment (Co-Zymase, Warburgsches Co-Ferment [1]), u.a.) und das Flavinenzym beteiligt sind und diejenige, bei welcher diese Komponenten nicht vorhanden sind.

Wir beschäftigen uns nur mit der zuerstgenannten Gruppe von Dehydrasen.

Es erübrigt sich eine Zusammenstellung aller Dehydrasen zu geben, die in dieser Richtung untersucht wurden, da sie von EULER und ADLER (22) in tabellarischer Übersicht zusammengefasst worden sind. Ich erwähne nur, dass Enzyme, die an der Dehydrierung von Alkohol (18, 21, 128), Äpfelsäure (127, 131, 128, 98, 5), Citronensäure (131, 128, 129), Glukose (3,98), Glycerinphosphorsäure (130), Hexosemono-und diphosphorsäure (141, 127, 98, 131), Milchsäure (Muskelpräparate, 131, 5) beteiligt sind, das Flavinenzym für ihre Wirkung bedürfen. Beispiele von Dehydrasen, die durch das Flavinenzym nicht aktiviert werden, sind die Milchsäuredehydrasen aus Hefe (4) und aus Coli-Bakterien (126), die Bernsteinsäuredehydrase (98), u.a. Dass die Fermente von verschiedener Herkunft sich ungleich verhalten können, zeigen die Milchsäuredehydrasen aus Hefe und aus Herzmuskeln.

Nicht nur das gelbe Ferment, sondern auch ein Co-Ferment ist ein integrierender Bestandteil dieser Dehydrierungssysteme. Sie zeigen eine starke Spezifität: z.B. wird das Enzym, welches den Robison-ester dehydriert, nur durch das Warburgsche Co-Ferment aktiviert (141), während die Aktivierung der Alkoholdehydrase bloss durch die Co-Zymase hervorgerufen wird (22). Eine vollständige Tabelle aller untersuchten Fälle findet man wieder in der Arbeit von EULER und ADLER (22). Die Glukosedehydrase der Leber ist das einzig bekannte Beispiel einer Dehydrase,

---

[1]) Das Warburgsche Co-Ferment = Co-Dehydrase II = das wasserstoffübertragende Co-Ferment.

die sowohl von der Co-Zymase wie von dem Warburgschen Co-Ferment aktiviert wird. (DAS, 12).

Eine Erklärung der Co-Fermentaktivierungen zu geben, die sicher für alle Fälle zutrifft, ist bis jetzt nicht möglich. Es war jedoch ein wesentlicher Fortschritt, als EULER und ADLER (20) nachweisen konnten, dass das Co-Ferment funktionell nicht mit dem Flavinenzym, sondern mit der Dehydrase verknüpft sei.

EULER und KLUSSMAN (34) beobachteten, dass die Geschwindigkeit der Dehydrierung von Alkohol durch Apozymase, mit Methylenblau als Wasserstoff-Acceptor, durch Belichtung erhöht wird. Während die Dehydrierung im Dunkeln allein stattfindet, wenn Flavinenzym und Co-Zymase zugefügt worden sind, tritt die Reaktion nach EULER und ADLER bei Belichtung auch ohne Flavinenzym ein. Diese Erscheinung ist so zu deuten: das Methylenblau wird von den Lichtstrahlen aktiviert und in dieser Form reagiert es sofort mit den aktivierten Substratwasserstoffatomen. Der Zusatz von Co-Zymase bleibt notwendig; sie reagiert also mit der Dehydrase.

Später weist EULER darauf hin, dass die Co-Fermente zu denjenigen Stoffen zu rechnen sind, welche in Verbindung mit einer ligatorischen Gruppe (einem Träger) einen sehr viel höheren, oft spezifischeren Grad von Aktivität gewinnen können. „Die Verbindung eines solchen Aktivators mit einer ligatorischen Gruppe nimmt den Charakter eines Enzyms an, dessen katheptische Gruppe der Aktivator darstellt". (EULER, 24, Seite 1). Analoge Erscheinungen beobachtet man bei der Flavinphosphorsäure (114, 119, 121) und vielleicht beim Chlorophyll (111). Man ist noch weit davon entfernt, erwiesen zu haben, dass man diese Anschauung auf alle obengenannte Enzymsysteme übertragen darf. Ihre Richtigkeit wurde jedoch für einen Fall gezeigt durch die Untersuchungen von WARBURG und CHRISTIAN.

Sie isolierten aus Rattenblutzellen (135, 141) und aus Hefe (136, 141) einen Proteinkörper, den sie Zwischenferment nannten. Diese Substanz ist in sehr reiner Form von NEGELEIN und GERISCHER erhalten worden (96). Weder das Warburgsche Co-Ferment, noch das Zwischenferment allein hat Enzymcharakter und reagiert nicht mit dem Robisonester. Fügt man beide in aequivalenten Mengen zum Ester hinzu, so zeigt sich eine stürmische Reaktion, bei der das Co-Ferment unter Aufnahme von zwei Wasserstoffatomen den Robisonester zu Phosphohexonsäure oxydiert (147). Da das hydrierte Co-Ferment nicht Autoxydabel ist, ist die Reaktion nach der Hydrierung beendigt.

Das Co-Ferment und Zwischenferment verbinden sich zum wasserstoffübertragenden Ferment. Diese Reaktion ist umkehrbar. Aus Lichtabsorbtionsmessungen beim Bande 345 $m\mu$ (vgl. S. 77) konnten NEGELEIN und HAAS zeigen, dass bei einer Konzentration von etwa 10^{-5} mol/Liter die Hälfte des wasserstoffübertragenden Fermentes in Co-Ferment und Zwischenferment dissoziiert (97). Die Abweichungen, die THEORELL (117) bei seinen kataphoretischen Messungen erhalten hat, und nach den, beim pH 7,4,

keine Verbindung zwischen Co-Ferment und Zwischenferment nachweisbar ist, sind noch nicht erklärt worden.

Das Co-Ferment (Co) verbindet sich also mit seinem Träger (der bis jetzt Dehydrase (D) oder Zwischenferment genannt wurde) zum wirksamen wasserstoffübertragenden Ferment (DCo), die eigentliche Dehydrase. Diese reagiert mit dem Substrat (SH_2) nach der Gleichung

$$SH_2 + DCo \rightarrow S + DCoH_2$$

in der S das oxydierte Substrat darstellt.

Das hydrierte Ferment reagiert weder mit Luftsauerstoff, noch mit Methylenblau; vom Flavinenzym (F) wird es dehydriert:

$$DCoH_2 + F \rightarrow DCo + FH_2.$$

Da das hydrierte Flavinenzym autoxydabel ist, oder mit Methylenblau reagiert, geht die Reaktion bei Anwesenheit einer dieser H-Acceptore weiter, z.B. nach der Gleichung

$$FH_2 + O_2 \rightarrow F + H_2O_2.$$

Dass diese Anschauungsweise zutrifft, ist von Warburg, Christian und Griese (147) und von Euler und Adler (22) erwiesen worden. Die Befunde erklären, weshalb bei der „Aktivierung" sowohl ein Co-Ferment, wie das Flavinenzym notwendig sind.

§ 4. Die Co-Fermente.

A. *Die Co-Zymase.*

Ich möchte hier kurz näher eingehen auf die biologische Bedeutung der Co-Zymase. Nachdem Harden und Young nachgewiesen hatten, dass Hefepresssaft durch Dialyse in zwei Teile, einen enzymatischen, thermolabilen und einen thermostabilen, getrennt werden kann, welche beide an sich inaktiv, durch Vermischen wieder gärwirksam werden, hat man zeigen können, dass der thermostabile Stoff (die Co-Zymase nach Euler und Myrbäck, 35) auch viele andere Fermentwirkungen aktiviert. So ist sie verbunden mit der die alkoholische Gärung einleitenden oxydoreduktiven Spaltung der Hexosen bezw. Hexosemonophosphaten (36, 14), mit der Dehydrierung von Aethylalkohol, Ameisensäure, Äpfelsäure, Citronensäure, Glukose, Glutaminsäure, Milchsäure (Andersson, 8, 9). Dazu ist zu bemerken, dass diese Versuche ausgeführt worden sind, bevor die Trennung zwischen Warburgschem Co-Ferment und Co-Zymase noch bekannt war.

Zusammenfassende Berichte über Co-Zymase sind von Myrbäck (85, 88) veröffentlicht worden.

Die neuesten Ansichten, nach welchen die Co-Zymase die abgespaltene wirksame Gruppe eines Fermentes darstellt, wurden schon erwähnt. Sie enthält jedoch verschiedene Gruppen, die jede auf bestimmten enzymatischen Wirkungen aktivierend wirken können. So verliert sie durch Erwärmung ihre aktivierende Wirkung auf die Gärung, doch sie erhöht auch dann noch die Geschwindigkeit der Glykolyse der Rattenmuskeln (31, 32, 39).

Die chemische Konstitution der Co-Zymase wurde noch nicht völlig aufgeklärt. Myrbäck mit Larsson und Örtenblad (92, 93, 94), und Euler

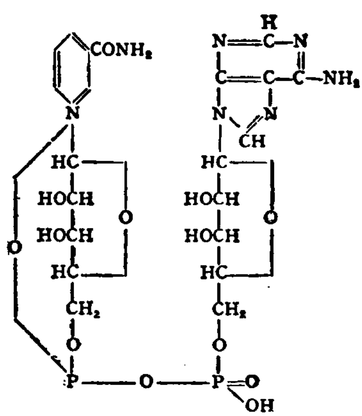
mit ALBERS und SCHLENK (27, 28) erhielten hochgereinigte Präparate aus Hefe. Sie sind jetzt völlig frei vom Warburgschen Co-Ferment (94, 28).

Co-Zymase ist ein Derivat von Adenylsäure, die durch eine kräftige Säure-Hydrolyse in Adenin und Ribose-Phosphorsäure gespaltet wird. Eine der OH-Gruppen des Phosphorsäure-restes der Adenylsäure ist wieder mit einem Stoff R esterartig verbunden. Denn, während die freie Adenylsäure zwei Aequivalente Lauge verbraucht bei der Neutralisierung gegen Phenolphtalein, verbraucht die Co-Zymase nur eines (87). Nach MYRBÄCK würde ein Teil der Formel sein: $C_5H_4N_5$-$C_5H_8O_3OP(OH)R$. Da bei der Hydrolyse auch Nicotinsäure-amid gebildet wird, muss die Restgruppe R diese Substanz enthalten (28).

Co-Zymase ist eine stark reduzierende Substanz (88, 90, 94). Durch kurze Erhitzung in schwach alkalischer Lösung (5 Min. in 0,03 n NaOH) wird die reduzierende Gruppe vernichtet (etwa 2/3 der reduzierenden Wirkung verschwindet) und eine saure Gruppe entsteht. Die Substanz wird völlig inaktiviert. Diese Reaktion ist keiner Spaltung der Bindung zwischen Adenylsäure und Stoff R zuzuschreiben, bei der die zweite OH-Gruppe des Phosphorsäure-restes frei werden sollte. Das erwies sich nach Untersuchung der Einwirkung der Adenylsäure-desaminase (95). Das Enzym, das nur Adenylsäure und Adenosin angreift, desaminierte weder die aktive, noch die inaktive Co-Zymase. Bei alkalischer Erwärmung wird also der Rest R nicht von der Adenylsäure abgelöst; auch muss die reduzierende Gruppe sich in R befinden.

Das Vorkommen der reduzierenden Gruppe ist für die Tätigkeit der Co-Zymase wesentlich, da ihre Inaktivierung mit der Zerstörung des Reduktionsvermögens parallel geht, sowohl in ihrem zeitlichen Verlauf, wie in ihrer Abhängigkeit vom pH (94).

In einer soeben erschienenen vorläufigen Mitteilung geben SCHLENK und EULER als Arbeitshypothese die folgende Formel der Co-Zymase, welche die erwähnten Eigenschaften dieser Substanz zum Ausdruck bringt (107):



Die Frage, ob die als Co-Zymase bezeichneten Präparate von verschiedener Herkunft gleich sind, kann man natürlich nicht in aller Schärfe beantworten. Nur so viel ist sicher, dass MYRBÄCK aus verschiedenem Material (z.B. aus Kaninchenmuskeln) einen Stoff isolieren konnte, der

völlig mit der Hefe-Co-Zymase identisch ist (89), und dass EULER und GÜNTHER nur sehr geringe Differenzen in der Temperaturstabilität zwischen der Hefe-, Muskel- und Erbsen-Co-Zymase beobachten konnten (30).

B. *Das wasserstoffübertragende Co-Ferment.*

Das wasserstoffübertragende Co-Ferment ist die wirksame Gruppe der Hexosemonophosphorsäure-Dehydrase (S. 74). Es ist von WARBURG und CHRISTIAN aus Pferdeblutzellen und Herzmuskeln isoliert worden (135, 136, 147), später auch von EULER und ADLER aus Hefe (22). Aus 250 L Pferdeblut wurde 1 gr der Substanz erhalten. Die reinsten Präparate (146, 147) enthalten 12,9% N und 12,3% P. Sie liefern bei der hydrolytischen Spaltung Phosphorsäure (3 Mol), Adenin (1 Mol), Nicotinsäure-amid (1 Mol), und eine Pentose (2 Mol). Das Vorkommen dieser Spaltungsprodukte weist schon auf die chemisch nahe Verwandtschaft zwischen diesem Co-Ferment und der Co-Zymase hin. WARBURG und CHRISTIAN (147) geben als die wahrscheinlichste empirische Formel: $C_{21}H_{28}O_{17}N_7P_3$.

Durch Kataphorese-Versuche hat THEORELL (115) nachgewiesen, dass das Co-Ferment eine Säure ist, die in zwei Stufen dissoziiert. Jede Stufe entspricht eine Dissoziation von zwei H-Ionen (116). Es handelt sich wahrscheinlich um eine einfache Veresterung von zwei Phosphorsäureresten; der dritte ist mehrfach verestert, so dass dieser nicht als eine Säure titriert werden kann.

Die Wirkung des Co-Ferments wird durch Temperaturerhöhung vernichtet; am leichtesten in schwach alkalischer Lösung (142). Auch durch Bestrahlung mit ultra-violettem Licht wird es inaktiviert (145).

Die katalytische Wirkung des wasserstoffübertragenden Co-Ferments liegt in seiner reversiblen Reduzierbarkeit (147); ein Molekül Wasserstoff wird gebunden. Durch Platin und Wasserstoff, in alkalischer Lösung, wird es irreversibel hydriert, unter Aufnahme von 3 Molekülen Wasserstoff. Nach einer reversiblen Hydrierung nimmt es bei dieser Behandlung nur zwei Wasserstoffmoleküle auf.

Der Pyridinring des Co-Ferments nimmt bei diesen Hydrierungsreaktionen den Wasserstoff auf; er wandelt sich nach totaler Reduktion in einen Piperidinring um, da jetzt nach Säurehydrolyse kein Nicotinsäureamid nachweisbar ist. Diese Erscheinungen wurden ebenfalls durch Untersuchung des Ultraviolettspektrums des Co-Ferments und seine Änderungen bei der Hydrierung erwiesen. Das Co-Ferment zeigt einen Absorbtionsband bei 260 mμ, der von den C=N-Bindungen verursacht wird (3 in Adenin und 1 in Nicotinsäureamid). Nach der totalen Reduktion ist der Band abgeschwächt, da die C=N-Bindung des Nicotinsäureamids verschwindet. Bei der reversiblen Hydrierung bleibt der Band 260 m μ unvermindert bestehen und ist ein neuer Absorbtionsband bei 345 m μ nachweisbar. Im Pyridinring verschwindet also die C=N-Bindung nicht, und muss die reversible Reduktion an einer der C=C-Bindungen stattgefunden haben (147).

Das Warburgsche Co-Ferment aktiviert die Dehydrierung von Hexosemonophosphorsäure (135, 147), Milchsäure, Äpfelsäure (131), Glukose (25, 12) und Citronensäure (128). Doch besteht die Möglichkeit, dass die verwendeten Präparate mit Co-Zymase verunreinigt waren.

Das wasserstoffübertragende Co-Ferment und die Co-Zymase sind chemisch nahe verwandt und zeigen in ihrer biologischen Bedeutung grosse Übereinstimmung. Ich fasse im Folgenden die Differenzen, die zwischen beiden bekannt sind, in tabellarischer Form zusammen:

1. Co-Zymase aktiviert die Alkoholdehydrase (21, 27), und nicht die Hexosemonophosphorsäuredehydrase.
   Co-Dehydrase II aktiviert die Hexosemonophosphorsäure-Dehydrase (141) und nicht die Alkoholdehydrase.
2. Co-Zymase enthält 2 P-Atome (28).
   Co-Dehydrase II enthält 3 P-Atome (147).
3. Co-Zymase ist eine einbasische Säure (28).
   Co-Dehydrase II ist eine vierbasische Säure (115, 116).
4. Co-Zymase ist relativ stabil gegen Temperaturerhöhung; Co-Dehydrase II wird schneller inaktiviert (24).
5. Durch Adsorbtion an Aluminiumoxyd oder durch Cuprosalz-Fällungen ist eine Trennung der beiden Co-Fermente möglich (22, 28).

§ 5. Das Flavinenzym.

WARBURG und CHRISTIAN isolierten aus Bierhefe das gelbe Oxydationsferment (Flavinenzym) (136, 141), das später von THEORELL in sehr reiner Form erhalten wurde (114, 121). Erwähnt wurde schon, dass bei der Dehydrierung von Hexosemonophosphorsäure zu Phosphohexonsäure (147), der Substratwasserstoff auf den Co-Enzymteil der Dehydrase übertragen und von der Farbstoffkomponente des Flavinenzyms aufgenommen wird unter Bildung einer Dihydroverbindung (Leukoflavinenzym). Dementsprechend kommt es im anaeroben Versuch zu einer Entfärbung des Flavinenzyms, die WARBURG und CHRISTIAN in lebenden Milchsäurebakterien (Bact. Delbrückii) spektroskopisch nachweisen konnten (139, 141). Bei Zutritt von Luft reagiert das Leukoflavinenzym mit dem Sauerstoff und in wenigen Sekunden erscheint die gelbe Farbe wieder. Bei dieser Reaktion entsteht Wasserstoffsuperoxyd (141).

Die wasserstoffübertragende Wirkung des gelben Ferments wird vernichtet, sobald die Flavinkomponente vom Eiweissrest abgespaltet wird (114).

THEORELL hat die Wirkungsgruppe des Hefeflavinenzyms rein dargestellt (119), während THEORELL, KARRER, SCHÖPF und FREI sie aus der Leber isolieren konnten (123). Sie ist eine Flavinmonophosphorsäure: $C_{17}H_{21}O_9N_4P$ (119) und verhält sich in jeder Beziehung als ein Co-Ferment: sie ist kochbeständig, dialysabel, steht chemisch den Nucleotiden nahe und zeigt keine Fermentwirkung. Die reinsten Enzympräparate enthalten 0,64% ihrer Menge an Flavinphosphorsäure (121).

Die Proteinkomponente erhält man durch Dialyse des gelben Ferments gegen verdünnte Salzsäure (114, 121). Sie kann sich mit der Flavinphosphorsäure vereinigen und der synthetische Produkt zeigt grösstenteils die gleiche enzymatische Wirksamkeit wie das natürliche gelbe Ferment (121, 123). Die Wirkungsgruppe zeigt aber eine ausgesprochene Spezifität in Bezug auf den kolloidalen Träger; dieser ist durch keine andere Eiweisssubstanz als die natürliche zu ersetzen (121, 119).

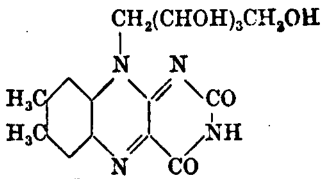
Man kann die Wirkungsgruppe weiter aufspalten in Flavin und Phosphorsäure. Das Flavin verbindet sich nicht mit der Eiweisskomponente zum gelben Ferment (118). Eine Trennung zwischen Ferment und Flavin (und freier Wirkungsgruppe) wird ermöglicht, weil letzteren durch dünne Kollodiummembranen diffundieren. Diese Eigenschaft benutzt man bei der quantitativen Bestimmung des Flavinenzyms.

In der Natur liegen freie und gebundene Flavine vor, sowohl in aeroben wie in anaeroben Zellen. Freie Flavine findet man vorwiegend in Kuhmilch (Lactoflavin), Harn und in den Netzhäuten der Fische (68, 62, 15, 16, 19),

während das Enzym besonders in Zellen mit einer starken Atmung vorkommt (Milchsäurebakterien, Hefe, Leber, Niere, Herz, 141, 16, 76). Tabellarische Übersichte der in den Zellen vorhandenen Flavinmengen, findet man in den Arbeiten von EULER und Mitarbeitern und von WAGNER-JAUREGG (17, 26, 16, 76, 125).

Das Flavin ist rein dargestellt worden aus Leber (51, 75), Löwenzahnblüten (55), Milch (66) und Grünalgen (43). Die Produkte verschiedenster Herkunft (aus Leber, Gras, Malz, Eigelb, Fischaugen) sind mit Lactoflavin identisch (75, 51, 67, 54, 48, 56).

Lactoflavin hat die Strukturformel:



(6,7-Dimethyl-9 (d,1-ribityl) iso-alloxazin)

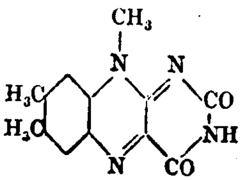
in welcher die Zuckerseitenkette ein d-Riboserest ist.

Synthetisches Lactoflavin wurde von KARRER und von KUHN hergestellt (47, 33, 57). Auch Flavine mit anderen Zuckerresten sind beschrieben worden; so sind 6 Stereo-isomeren des Lactoflavins bekannt (52). Ihre physischen Eigenschaften sind fast nicht von der chemischen Konstitution des Zuckerrestes abhängig, während die physiologische Wirkung beim Ersatz des d-Riboserestes durch andere Zucker, soweit die Erfahrungen reichen, vollständig aufhört (untersucht wurde nur die Wachstumswirkung auf Ratten, als Vitamin B_2, 33). Auch die Stellung der Phosphorsäure im Molekül scheint von Bedeutung zu sein (72, 73, 104, 125).

Durch Belichtung in ½n Natronlauge wird das Flavin, das ein grün fluoreszierender, leicht löslicher Farbstoff ist, in einen Photoderivat (Lumiflavin) von ähnlichen spektralen Eigenschaften umgewandelt. Während das Flavin sich aus seinen wässrigen Lösungen weder bei alkalischer, noch bei saurer Reaktion mit organischen Lösungsmitteln ausschütteln lässt, geht das Lumiflavin bei saurer Lösung leicht in Chloroform über. Hier hat man also eine Möglichkeit gefunden, die Trennung zwischen beiden Substanzen zu Stande zu bringen.

Das grüne Fluoreszenzlicht des Lumiflavins erscheint bei spektraler Zerlegung als einen kontinuierlichen Band, der von 500 bis etwa 630 m μ reicht (138). Seine Intensität ist abhängig vom pH und von den Substanzmengen (49, 69).

Das Lumiflavin kristallisiert und hat die Zusammensetzung $C_{13}H_{12}N_4O_2$ (137, 138, 140). Es wurde synthetisch dargestellt (110, 71) und hat die Formel:



6, 7, 9, trimethyl-iso-alloxazin)

Die photochemische Zerstörung des Flavins ist jedoch eine sehr komplizierte Reaktion. In schwach saurer Lösung entsteht ein blaufluoreszierender Stoff: das Lumichrom, während in schwach alkalischer Lösung, Lumichrom und Lumiflavin gebildet werden. Lumichrom ist 6,7-Dimethyl-alloxazin ($C_{12}H_{10}O_2N_4$; 50, 53, 74).

Theorell (122) hat nachgewiesen, dass die Zerstörung in Abwesenheit von Sauerstoff viel schneller geht als wenn Sauerstoff anwesend ist; auch erfolgt der Abbau bei saurer Reaktion am langsamsten und im alkalischen Milieu am schnellsten. Bei der Bestrahlung ohne Sauerstoff bildet sich zuerst Deuteroleukoflavin, mit Sauerstoff oxydiert es sich sofort zum Deuteroflavin. Nur in stark alkalischer Lösung geht das Deuteroflavin quantitativ in Lumiflavin über und wird kein Lumichrom gebildet. Der Sauerstoff wirkt also schützend gegen die Zerstörung durch Belichtung, doch ist er für die Bildung des Lumiflavins unbedingt erforderlich.

Es ist wichtig zu bemerken, dass unter bestimmten Verhältnissen die Umwandlung des Flavins in Lumiflavin mit sehr guter Ausbeute vor sich gehen kann, unabhängig von dem Reinheitsgrad des Präparates (76).

Die Flavine und ihre Leukoverbindungen stellen Redoxsysteme dar. Auf diese Eigenschaft ist die Wirkung des gelben Ferments zurückzuführen. Man hat das Redoxpotential des Lactoflavinsystems, im aequimolaren Gemisch der oxydierten und reduzierten Stufe auf —0,2 V. (pH : 7,0) bestimmen können (10, 70, 109). Die Leukoverbindungen haben also eine kräftig reduzierende Wirkung.

Das freie Flavin kann ebenfalls als Wasserstoffacceptor bei enzymatischen Dehydrierungsreaktionen fungieren (132). So ist es auch klar, dass der Zusatz von freiem Flavin zu Zellen eine Atmungssteigerung hervorrufen kann. Nach Euler und Adler erhöht Lactoflavin die Atmung der Milchsäurebakterien (Thermobacterium helveticum) (1); nach Laser die von Bindegewebskulturen (80).

§ 6. Über die Beteiligung des Flavinenzyms an den Atmungsreaktionen.

In § 3 habe ich den Mechanismus der Substratoxydation durch Sauerstoff, wie er in vitro durch das System der Dehydrase, des Co-Fermentes und des Flavinenzyms stattfindet, beschrieben. Würden diese Reaktionen auch in vivo verlaufen, so wäre ein Weg der Sauerstoffatmung der lebenden Zellen bekannt. Das gelbe Ferment wäre dann ein notwendiger Zwischenkatalysator eines Atmungsprozesses.

Nur ein einziges Beispiel eines Atmungsvorganges ist bekannt geworden, in welchem ein Dehydrierungssystem, nach obenerwähntem Prinzip, wirksam ist. Es ist die Sauerstoffatmung anaerob gezüchteter Milchsäurebacterien (Bact. Delbrückii), also ein sehr unphysiologischer Prozess.

Warburg und Christian (141) gründen diese Auffassung auf folgende Erwägungen: die Zellen entbehren das sauerstoffübertragende Häminferment; die Atmung wird weder durch Blausäure, noch durch Kohlenoxyd gehemmt; die Bakterien enthalten viel gelbes Ferment; Wasserstoffsuperoxyd wird gebildet und man kann spektroskopisch die Oxydation und Reduktion der Wirkungsgruppe des Flavinenzyms während der Atmung

verfolgen. Auch ist die, aus Atmung und Farbstoffgehalt der Bakterien, errechnete katalytische Wirksamkeit des gelben Ferments gleich der in vitro gefundenen.

Als Mass der katalytischen Wirksamkeit wählten sie die Wechselzahl. Aus dem Flavingehalt der Bakterien kann man leicht die Sauerstoffmenge berechnen, die das Leukoflavinenzym bei einer einmaligen Oxydation bindet (a Mole). Setzt man voraus, dass das gelbe Ferment allen aktivierten Substratwasserstoff überträgt, und ist ausserdem die Atmungsgrösse der Bakterien bekannt (b Mole O_2 pro Minute), so ergibt sich, wie oft das Ferment seinen Oxydationszustand pro Minute wechselt. Dieser Wert (b/a) wird als Wechselzahl bezeichnet. Sie beträgt für Milchsäurebakterien ± 30, und ist von derselben Grössenordnung, wie die Zahl, die im Modellversuch (die Oxydation der Hexosemonophosphorsäure) erhalten wurde. Hier ist der höchst gemessene Wert der Wechselzahl 55 (b stellt dann die Oxydationsgeschwindigkeit im Modellversuch dar, 121).

Obschon das gelbe Ferment in allen bisher untersuchten, aeroben Zellen vorkommt, ist es sehr merkwürdig, dass die Sauerstoffatmung durch das Ferment quantitativ bedeutungslos ist. Ich möchte jedoch gleich bemerken, dass diese Meinung sich nur gründet auf Versuchsresultaten, die mit Hefe und Essigbakterien gewonnen wurden.

Blausäure und Kohlenoxyd hemmen die Wirkung des gelben Fermentes im Modellversuch nicht; da sie jedoch die Atmung der lebendigen Hefezellen, u.a. sehr stark hemmen, kann das Flavinenzym nur in geringen Masse an dem normalen Atmungsprozess dieser Zellen beteiligt sein. Aus der Grösse der Wechselzahl berechneten Warburg und Christian, dass das gelbe Ferment in der Bäckerhefe 1/27 und in den Essigbakterien 1/630 des Atmungssauerstoffs übertragen kann.

Cytolysiertes und klar zentrifugiertes Blut oxydiert zugefügtes Hexosemonophosphat nicht, obwohl das Monophosphat-Dehydrasesystem sich in der Lösung befindet. In der Flüssigkeit (und in den Blutzellen) liegt also ein Mechanismus vor, der in noch vollkommen unbekannter Weise, verhindert, dass das Flavinsystem wirksam ist (135).

Ogston und Green haben nachgewiesen, dass die Veratmung von Milchsäure, Hexosemono- und diphosphorsäure und von Alkohol durch Hefe völlig von Blausäure gehemmt wird, obschon in den Zellen Dehydrasen anwesend sind, deren Wirkung für dieses Gift unempfindlich ist (99).

Man darf die Versuche über die Atmungshemmungen durch Blausäure nicht so erklären, dass der Luftsauerstoff vom Häminferment aktiviert wird und in dieser Form nicht das Substrat, sondern das Leukoflavinenzym oxydiert. Dann müsste in blausäurevergifteten Zellen die Oxydation des gelben Fermentes gehemmt sein, was nicht der Fall ist. Das Flavinenzym ist also nicht mit dem Eisensystem verbunden, sondern liegt frei neben ihm. Ihre Wirkung beobachtet man in der HCN-unempfindlichen Restatmung (vgl. jedoch 7).

Alle diese Versuche weisen darauf hin, dass in den untersuchten aeroben Zellen, trotz der Anwesenheit von Substrat,

Sauerstoff und von einem Dehydrase-Flavinenzymsystem, letzteres nicht, oder in sehr geringen Mengen den veratmeten Sauerstoff überträgt. Deshalb halten WARBURG mit CHRISTIAN (141) und OGSTON mit GREEN (99), die im isolierten System verwirklichte Funktion des Flavinenzyms, als Wasserstoffüberträger mit Sauerstoff als Acceptor, für künstlich und unbiologisch. Wie erwähnt, trifft dies für Hefe und bestimmte Bakterien zu; ob es auch für jedes beliebige, aerob atmende Zellmaterial immer zutreffen wird, wäre noch näher zu beweisen.

Es liegen bis jetzt nur wenige Untersuchungen vor, die zeigen, dass die Flavinenzymmenge der Zellen keine konstante Grösse ist und dass sie vom Entwicklungszustand und den Aussenbedingungen abhängt.

Nachdem ich (45) nachgewiesen hatte, dass die gesammte Flavinmenge in Erbsenpflanzen während der Keimung fortwährend zunimmt, beobachteten EULER und DAHL dieselbe Erscheinung bei Hafer (29). Die Menge des gelben Fermentes nimmt dabei relativ ab, jedoch bedeutete es immer noch eine grosse absolute Steigerung seiner Menge.

In etiolierten Pflanzen befindet sich mehr Flavin als in grünen Pflanzen (26, 45).

PETT untersuchte, in wie weit die Flavinbildung der Hefe von den Aussenbedingungen abhängig ist. Nach Phosphatzusatz zur Nährlösung wird die Menge grösser; so auch nach Zusatz von den Substanzen, die den normalen Atmungsmechanismus schädigen oder unwirksam machen (z.B. mit KCN, 100, 101).

III. METHODISCHES.

§ 7. Isolierung und Bestimmung der Enzyme und Co-Fermente.

In diesem Abschnitt gebe ich eine kurze Beschreibung der Isolierungs- und Bestimmungsmethoden der in dieser Untersuchung verwendeten Enzyme und Co-Fermente.

A. 1. *Das Flavinenzym.*

Das gelbe Ferment isolierte ich aus Bierhefe, nach dem von WARBURG und CHRISTIAN (41) angegebenen Verfahren.

In der üblichen Weise wird aus der Trockenhefe der „Lebedew"-Saft bereitet und dieser mit Bleisubacetat (1/10 der von WARBURG und CHRISTIAN verwendeten Menge) von vielen Begleitstoffen befreit. Nach Entfernung des überschüssigen Bleis aus der Flüssigkeit, erhält man das Enzym durch eine fraktionierte Acetonfällung, nach Sättigung der Lösung mit Kohlensäure. Man löst den enzymhaltigen Niederschlag in Wasser und wiederholt das Verfahren zwei Mal. Dann wird das gelbe Ferment mit Methanol gefällt und getrocknet.

Nach dem zweiten Reinigungsverfahren der genannten Forscher wird

das Fermentpulver mit 1%-iger Kochsalzlösung verrieben und mit etwas Chloroform und Octanol geschüttelt. Nach Zentrifugierung, dialysiert man die Lösung und wird sie im Vakuumexsiccator zum Trockne verdampft. Das Enzympräparat enthält etwa 0,4 mgr. Lumiflavin pro gr Trockensubstanz.

2. *Die Bestimmung der totalen Flavinmenge.*

Zur Flavinbestimmung sind die zerriebenen Pflanzenteile mit 60%-igem Alkohol bei 60°-70° während 3 bis 4 Stunden extrahiert worden; danach der Geweberückstand noch zwei Mal. Alles vorhandene Flavin löst sich in dieser Weise. Die vereinigten Alkoholextrakte werden im Vakuum bei 40° eingeengt bis auf etwa 30 ccm, worauf man den eingetretenen Niederschlag abzentrifugiert. Man schüttelt die Lösung mit Aether aus, bis dieser keine Fluoreszenz mehr zeigt. Der wässrige Extrakt wird alkalisch gemacht (½ n NaOH). Durch Belichtung, mit einer 500 Watt, Lampe während 3 Stunden in etwa 10 cm Entfernung unter gleichzeitiger Wasserkühlung und Lüftung, wird das Flavin in Lumiflavin übergeführt. Man extrahiert das Photoderivat aus saurer Lösung vollständig mit Chloroform und trocknet über wasserfreiem Natriumsulfat.

Die Flavinbestimmung gründet sich auf die Fluoreszenzmessung dieser Lumiflavinlösung mit dem Zeiss-schen Stufenphotometer oder mit dem von COHEN konstuierten Apparat (11). Als Fluoreszenzstandard verwendete ich Lösungen von reinem Lumiflavin. Es wurde also die Methodik des Stockholmschen Biochemischen Institutes angewandt, die genau beschrieben worden ist von EULER und DAHL (29).

Die Überführung des Flavins in Lumiflavin ist keine quantitativ verlaufende Reaktion. Durch Kontrollmessungen konnte gezeigt worden, dass die Verluste gering sind (26, 45). Was die Versuchsfehler der Messungen anbetrifft, so dürften diese höchstens 10% betragen.

Ich weise darauf hin, dass ich alle in dieser Arbeit angegebenen Flavinmengen in γ Lumiflavin ausgedrückt habe.

3. *Das Lumiflavin.*

Die Lumiflavinbestimmung beruht auf dem Vergleich der Intensität des Fluoreszenzlichtes der zu messenden Lösung und einer Lösung, mit bekanntem Gehalt der reinen Substanz.

Das kristallisierte Lumiflavin, dass ich für diese Vergleichslösung brauchte, habe ich in folgender Weise erhalten. Ich extrahierte das Flavin aus Bäckerhefe mit verdünntem Alkohol. Letzterer wird aus dem Extrakt im Vakuum entfernt, die Trübung abzentrifugiert und die Lösung mit Aether ausgeschüttelt. Nach Verjagen des Aethers wird die wässrige Schicht auf 3% HCl gebracht. Durch Adsorbtion an Fullererde und Elution mit einem Gemisch von Wasser, Methanol und Pyridin (Volumverhältnis 2 : 1 : 1) reinigt man den Farbstoff (26). Die Elution wird im Vakuum auf kleines Volumen eingeengt und von kolloidal gelöster Fullererde befreit durch Fällen mit Alkohol. Der Alkohol wird entfernt, das Flavin durch Belichtung in Lumiflavin übergeführt und dieses nach WARBURG und CHRISTIAN gereinigt (141). Das Lumiflavin kristallisierte nach der Reinigung in saurer Lösung aus.

B. *Das Zwischenferment.*

Das Zwischenferment habe ich aus „Lebedew"-Saft erhalten, nach WARBURG und CHRISTIAN (141). Durch Verdünnung des Saftes mit Wasser

und nach Sättigung mit Kohlensäure bildet sich in der Kälte ein Niederschlag des Fermentes, der sich mit Bicarbonat im ursprünglichen Volumen Wasser löst.

C. *Die Apo-Zymase.*

Die Trockenunterhefe wird mit Wasser geschüttelt und abzentrifugiert. Man wiederholt das Waschen so oft, bis der Rückstand mit Zucker, Phosphat und Zymophosphat gemischt, nur eine schwache Gärung gibt (höchstens 0,2 ccm CO_2 pro Stunde und 400 mgr Trockensubstanz des Enzyms). Das Ferment wird in einer dünnen Schicht auf Glasplatten gestrichen. An der Luft trocknen lassen. Man zerkleinert die trockene Apo-Zymase grob (MYRBÄCK, 85).

Die verschiedenen Präparate zeigen bisweilen eine ungleich starke Gärwirkung; auch verschlechteren sie nach längerem Aufbewahren. Deshalb habe ich jede Monat die älteren Präparate auf ihre Aktivität geprüft durch Vergleich mit einem frisch hergestellten. Die maximale Gärgeschwindigkeit der Apo-Zymase (400 mgr) war nie geringer als 20 ccm CO_2 pro Stunde.

D. *Die Alkoholdehydrase.*

Diese wurde nach einem Vorschrift von EULER und ADLER (25) hergestellt. Man schüttelt die Trockenunterhefe mit der 10-fachen Menge Wasser und etwas Chloroform und zentrifugiert vom Ungelösten ab. Bei Gefriertemperatur fällt man die Dehydrase mit 2/3 des Volumens Alkohol, wäscht mit Aether und trocknet. 200 mgr der Fällung wird in 10 ccm Phosphatpuffer (pH : 6, 8) gelöst und klar zentrifugiert.

Die Lösung enthält sehr wenig Co-Zymase.

E. *Die Katalase.*

Die Katalase wurde aus dem Sauromatum-Gewebe isoliert nach v. HERK und BADENHUIZEN (46). Man fällt eine wässrige Lösung des zerriebenen Gewebes mit der doppelten Menge Alkohol bei 0° und trocknet den Niederschlag im Vakuumexsiccator. Dieser wird in Wasser suspendiert, während einer Stunde geschüttelt und klar zentrifugiert. Nach Adsorption an gereinigtem Kaolin und Elution, erhält man eine Katalase-Lösung, die fast völlig frei ist von Co-Zymase oder Co-Dehydrase II.

F. 1. *Die Co-Zymase.*

Die gereinigte und in Wasser suspendierte Hefe erwärmt man während ¾ Stunden auf 75°—80° und entfernt die Hefereste. Der Saft wird vollständig mit Bleiacetat gefällt; die Co-Zymase bleibt in der Lösung. Quecksilbernitrat fällt sie aus neutraler oder schwach saurer Lösung. Das Salz wird zerstetzt mit H_2S, die Flüssigkeit filtriert und durchlüftet. Phosphorwolframsäure fällt die Co-Zymase dann in saurer Lösung. Der mit verdünnter Schwefelsäure gewaschene Niederschlag wird in einer 1%-igen Lösung dieser Säure aufgeschlämmt und während einer Stunde mit einem Gemisch von Aether und Amylalkohol (1 : 1) geschüttelt. Nach Entfernung der Schwefelsäure mit Baryt, fällt man die Co-Zymase wieder mit Silbernitrat aus salpetersaurer Lösung. Durch Zusatz von Ammoniumhydroxyd kann man verschiedene Fällungen erhalten, die nach Zersetzung mit H_2S, Entfernung der Fällung und nach Durchlüftung, die reine Co-Zyamselösungen geben (MYRBÄCK, 85).

Diese Präparate wurden in den folgenden Versuchen fast immer verwendet; sie enthalten neben Co-Zymase, auch Co-Dehydrase II.

War eine Trennung der beiden Co-Fermente erforderlich, so wurde sie

nach einer Vorschrift von MYRBÄCK und ÖRTENBLAD (94) ausgeführt. Mit dieser Arbeitsmethode erhielt ich öfters weniger gute Resultate; eine so grosse Steigerung des Reinheitsgrades der Co-Zymase, wie die Forscher beschrieben haben, beobachtete ich nicht. Im Laufe dieses Jahres hat man andere und bessere Trennungsmethoden ausgearbeitet, doch sie konnten in dieser Untersuchung noch keine Anwendung finden.

Co-Zymase wird mit Uranylacetat gefällt und der Niederschlag mit Phosphat zersetzt. Die Herauslösung aus der Fällung gelang nur unvollkommen. Begleitstoffe werden durch vorsichtigen Zusatz von Silbernitrat und Ammoniak gefällt und dann die Co-Zymase mit Quecksilbernitrat. Man zersetzt das Salz mit H_2S, entfernt den Niederschlag und durchlüftet. Diese Co-Zymase-Lösung zeigte keine Co-Dehydrase II-Wirkung.

2. *Die Bestimmungsmethode.*

Die Co-Zymase-Bestimmung ist ausgeführt worden nach MYRBÄCK und EULER (91). Sind Apo-Zymase (400 mgr), Glukose (100 mgr) und Hexosediphosphorsaures-Na (0,1 ccm einer 10%-igen Lösung) in einer 10%-igen Phosphatlösung (0,5 ccm, pH : 6,4) in Überschuss vorhanden, so ist die entwickelte CO_2-Menge proportional der zugefügten Co-Zymasemenge (x ccm der Co-haltigen Lösung und (1,4 — x) ccm Wasser), wenn man, nach Verlauf einer gewissen Induktionszeit, die maximale Gärungsgeschwindigkeit bestimmt. Die Bestimmungen sind immer mit zwei ungleichen Mengen der zu prüfenden Lösungen gemacht worden (x und ½ x ccm); sie stimmen innerhalb den Messfehlern überein (± 4%).

Eine Co-Einheit ist die Co-Zymasemenge, die unter diesen definierten Bedingungen bei 30° 1 ccm CO_2 pro Stunde entwickelt. Der Reinheitsgrad eines Co-Zymasepräparates (ACo) ist gleich die Anzahl Co-Einheiten pro Gramm Trockensubstanz. (85).

G. 1. *Die Co-Dehydrase II.*

Die Präparate wurden nach den Vorschriften von WARBURG und CHRISTIAN (141) dargestellt und enthielten noch Co-Zymase.

Pferdeblutzellen werden gewaschen, zentrifugiert, haemolysiert und die Lösung sofort mit dem gleichen Volumen Aceton gefällt. Das Zentrifugat, welches das Co-Ferment enthält, wird wieder mit dem gleichen Volumen Aceton versetzt und filtriert. Das Filtrat wird nach Einengen im Vakuum (50°—55°) in schwach essigsaurer Lösung fraktioniert gefällt mit Quecksilberacetat. Den Niederschlag zersetzt man mit H_2S, filtriert und durchlüftet. Mit Überschuss Aceton wird die Co-Dehydrase II wieder gefällt und nachher getrocknet.

2. *Die Co-Dehydrase II-Bestimmung.*

Die Bestimmung wird folgendermassen ausgeführt (142). Wenn im System: Flavinenzym, Co-Dehydrase II, Zwischenferment und Hexosemonophosphorsaures-Na, die Komponenten im Verhältnis zum Co-Ferment in genügendem Überschuss vorhanden sind, ist die O_2-Aufnahme der Co-Fermentmenge proportional. Die Messungen müssen immer mit zwei ungleichen Mengen der zu prüfenden Lösung gemacht werden und sofort nach dem Versuchsbegin anfangen. (Versuchsdauer: 30—40 Min). Die Ansätze enthalten: 1 ccm Zwischenferment; 0,2 ccm 0,3 m Hexosemonophosphorsaures-Na; 0,2 ccm 0,04 n KCN; x ccm Co-Dehydrase II und (2-x) ccm Wasser; im Anhang 0,4 ccm Flavinenzym (2-3 γ) und im Einsatz 0,2 ccm 10% KOH. Gasraum, Sauerstoff.

Eine Co-II-Einheit ist die Co-Dehydrase-II-Menge, die unter diesen definierten Bedingungen bei 37° 50 cmm O_2 pro Min. aufnimmt (141).

Auch an dieser Stelle möchte ich Prof. JANSEN und Prof. v. D. WIELEN, die mir die Messinstrumente zur Verfügung stellten, und Prof. KLUYVER, für die Überlassung von Hexosemonophosphorsäure, herzlichst danken. Die Hefe wurde mir bereitwilligst zur Verfügung gestellt durch die Brauereien „De Amstel" und „De Gekroonde Valk", beide in Amsterdam, wofür ich sie auch hier vielen Dank sage.

IV. DIE ATMUNG DER SAUROMATUM-KOLBEN.

§ 8. Die Intensität der Atmung in den Appendix-Geweben.

Die Infloreszenz von Sauromatum endet in einen auffallend braun- und rotviolett gefärbten, dünn cylindrischen und sterilen Körper (Appendix). Im Querschnitt zeigt der mittlere und untere Teil, ausser der Epidermis, eine 1—2 mm breite, gelbe Aussenschicht und eine farblose Innenschicht. Die Grenze ist scharf. Im Spitzenteil des Organs besteht diese Differenzierung nicht und liegt nur das gelbe Gewebe vor.

Während der Entwicklung ändern sich diese Gewebe. In ganz jungen, ungeöffneten Kolben ist die Aussenschicht nur schwach gefärbt und nimmt die Menge des Pigments bis zum Höhenpunkt der Blütenperiode zu. Der zentrale Teil ist anfangs ein einheitliches Gewebe; kurze Zeit nach der Öffnung des Kolbens nimmt sein Wassergehalt und Trockengewicht ab und bekommt er grosse Risse. Man kann sich kaum denken, dass die Markzellen zu dieser Zeit noch eine physiologische Bedeutung haben könnten.

Nach Versuch I spielen sich die intensiv verlaufenden Atmungsreaktionen ausschliesslich in der Aussenschicht ab. Pro Gramm Trockensubstanz und pro Stunde verbraucht sie 19,4 ccm Sauerstoff, während der zentrale Teil nur 1,8 ccm O_2 aufnimmt.

Die Atmung wird in üblicher Weise im Warburg-Apparat bestimmt (Gefässkonstante für Sauerstoff 1,5—1,9; das Volumen des Gewebes wird aus dem Frischgewicht berechnet). Das Material wird in dünnen Schnitten zerlegt, die eine Dicke von ± 1 mm haben. Sie werden 3 × in $^1/_{20}$ mol Phosphatpuffer gewaschen um den Inhalt der zerschnittenen Zellen zu entfernen. Das pH der Lösung ist 6,8, da dies nach v. HERK und BADENHUIZEN das Optimum pH-Gebiet der Atmung ist. Am Ende des Versuchs wurde das

VERSUCH I.

Die Atmung der Gewebeschnitte in 1,4 ccm $m/_{20}$ Phosphatpuffer, pH = 6,8. Einsatz der Gefässe enthält 0,3 ccm 5%-ige KOH. Temp. 20°. Gasraum: Sauerstoff. Kolben: sofort nach der Öffnung; Maximum der Erwärmung.

	„Gelbes" Gewebe		„Weisses" Gewebe		
Gefäss	1	2	3	4	5
Trockengewicht der Schnitte	18,2 mg	17,9 mg	27,3 mg	39,1 mg	32,2 mg
Glucose	——	——	——	0,2 ccm 10%	——
Hexosediphosphorsaures-Na	——	——	——	——	0,2 ccm 10%
Wasser	0,2 ccm	0,2 ccm	0,2 ccm	——	——
O_2-Aufnahme nach 10 Min	61 cmm	63 cmm	8 cmm	9 cmm	10 cmm
20 „	119	121	15	22	21
30 „	171	175	23	35	32
40 „	230	236	32	50	40
O_2-Verbrauch pro mg Trockensubstanz und Stunde:	19,0 cmm	19,8 cmm	1,8 cmm	1,9 cmm	1,9 cmm

Frischgewicht der Schnitte, nach dem Trocknen der Schnittflächen mit Filtrierpapier, bestimmt. Die Gefässe 4 und 5 wurden eine Stunde vor Beginn der Messungen geschüttelt, um das Maximum der Atmung zu haben, das nicht immer sofort bei Zusatz der verbrennlichen Substanz da ist.

Man kann die geringe Atmungsintensität des Markgewebes nicht einem Mangel an Verbrennungsmaterial zuschreiben, denn Zusatz von Glucose oder Hexosediphosphorsaurem-Na erhöht die Atmung nicht. Daraus ergibt sich, dass das Atmungsferment völlig gesättigt war und es folglich keine grössere Aktivität entwickeln könnte. Auf diese Erscheinung wurde in unserer ersten Mitteilung schon hingewiesen.

Alle Versuche, in den Abschnitten IV bis VII beschrieben, sind mit der isolierten Rindenschicht ausgeführt worden. Nur in den Fällen, in denen ich die Atmung grösserer Appendix-Stücke gemessen habe, wurde das Mark nicht entfernt. Das Resultat aber ändert sich deswegen wenig, da die Atmung dieses

Gewebes pro gr. Trockengewicht etwa 10 Prozent der totalen Atmungsintensität beträgt und ausserdem sein Trockengewicht kleiner ist als 10% des Wertes für den ganzen Kolben.

Die im Versuch I angewandte Untersuchungsmethodik: die Atmungsmessung dünner Gewebeschnitte in Phosphatpuffer, scheint auf dem ersten Blick eine sehr unphysiologische zu sein [1]. Es fragt sich zu beweisen, ob man bei dieser Anordnung den normalen Atmungswert messen kann. Versuch II erbringt den Beweis. Mit Rücksicht auf das Resultat von Versuch I benutzte ich nur das obere Ende der Kolbenspitze, das allein gelbes Gewebe enthält.

Die O_2-Aufnahme eines 50 mm langen Appendix-Stückes wird gemessen. (II A).

Das Atmungsgefäss hat ein Volumen von ± 100 ccm und enthält KOH (1,0 ccm 20%) zwecks Absorption der gebildeten Kohlensäure. Temp. des Thermostaten: 23°; Schüttelungsgeschwindigkeit 110 Mal pro Min. Gemessen wird die Volumänderung des Gases bei konstantem Druck. Ein leeres Kontrollgefäss wird ebenfalls geschüttelt. Genauigkeit der Bestimmung:

---

[1]) Nach Sanders wird die Wärmeproduktion von Arum durch Wundreiz stark gesteigert. Eine Erklärung dieser Erscheinung wurde nicht gegeben. Vielleicht wird sie dadurch hervorgerufen, dass die Atmungsgrösse des Gewebes durch eine mangelnde Sauerstoffversorgung beeinträchtigt ist, welche erst nach dem Zerschneiden des Organs, also durch Vergrösserung der Diffusionsoberfläche, den normalen Wert erreicht.

Beim grossen Sauerstoffverbrauch der Sauromatum-Kolben ist es wichtig zu untersuchen, ob die Sauerstoffversorgung bei den gewählten Versuchsbedingungen zureicht. Warburg hat für einen, von zwei parallelen Flächen begrenzten Gewebeschnitt, der sich in einer Lösung von konstanter Sauerstoffkonzentration befindet, die Grenzschnittdicke, die noch eine ausreichende Sauerstoffversorgung der innersten Teile des Schnittes erlaubt, abgeleitet.

$$d = \sqrt{8 c_0 \frac{D}{A}}$$

Hier bedeutet d: die Grenzschnittdicke (in cm); c_0: der äussere Sauerstoffdruck (in Atmosphären); D: der Diffusionskoeffizient des Sauerstoffs im Gewebe (man darf ohne grossen Fehler den Diffusionskoeffizienten im Gewebe der in Wasser gleichsetzen) und A: die Atmung in ccm O_2 pro Minute und ccm Gewebe.

Aus den Messungen von Versuch I berechnet sich diese Dicke zu 0,6 mm. Da der Einfluss der Interzellularen nicht berücksichtigt wurde, rechnet man zu ungünstig, so dass bei Einhaltung der angegebenen Dicke, die Atmungsgrösse nicht durch unzureichende Sauerstoffversorgung beeinträchtigt sein kann.

Aus Versuch II geht hervor, dass die Diffusionsgeschwindigkeit des Sauerstoffs im intakten Sauromatum-Appendix genügend gross ist. Deshalb ist von einer grösseren Oxydationsgeschwindigkeit nach dem Zerschneiden nichts zu bemerken.

VERSUCH II.

Kolben: sofort nach der Öffnung; Maximum der Erwärmung. Untersucht wird die Appendix-Spitze (nur „gelbes" Gewebe). Gasraum: Sauerstoff.

A.

O_2-Aufnahme eines 50 mm langen Stückes (Frischgewicht: 1,26 g; Trockengewicht: 147,8 mg)

nach 15 Min.: 1,09 ccm
„ 30 Min.: 2,04 ccm

O_2-Verbrauch pro mg Trockensubstanz und Stunde: 27,6 cmm

B.

O_2-Aufnahme von Gewebeschnitten (Trockengewicht: 14,3 und 11,2 mg)

nach 10 Min.:	67 ;	52 cmm
„ 20 „ :	129 ;	98 cmm
„ 30 „ :	186 ;	140 cmm

O_2-Verbrauch pro mg Trockensubstanz und Stunde: 26,0 und 25,0 cmm. Mittelwert 25,5 cmm.

0,04 ccm. Das Appendix-Stück wurde in der Mitte des Gefässes aufgehängt. Zwecks Vorbeugung des Eintrocknens sind die zwei Querschnittflächen mittels einer dünnen Schicht Kakaobutter verschlossen. Das ändert die Geschwindigkeit der O_2-Aufnahme nicht, wie aus mehreren Kontrollmessungen, ohne und mit Anwendung der Kakaobutter, hervorgeht. Bei längeren Versuchszeiten (einigen Stunden) ist diese Vorsichtsmassregel zu empfehlen, da sonst die Schnittflächen leicht austrocknen könnten. Die Bestimmung des Trockengewichts geschieht nach Entfernung der Kakaobutter.

Ebenfalls wird die O_2-Aufnahme etwa 0,7 mm dicker Gewebeschnitte gemessen (II B). Diese sind den Teilen des Kolbens entnommen worden, die sich direkt oben und unter dem im Makro-Versuch verwendeten Teil befinden. Dabei wählte ich eine gleiche Anzahl Schnitte aus dem oberen wie aus dem unteren Teil. So wird eine möglichst grosse Homogenität des Materials erreicht. Die Schnitte werden wie in Versuch I behandelt.

Vergleicht man die Werte der O_2-Aufnahme pro gr Trockensubstanz, so sind sie für das grosse Gewebestück und für die dünnen Schnitte fast gleich. Die Differenz von 8% liegt wahrscheinlich innerhalb der Versuchsfehler, da das Verhältnis zwischen Fermentmenge und Trockengewicht für die Schnitte immer kleiner ist als für ein grösseres Gewebestück. Man entfernt wohl den Inhalt, jedoch nicht die Wand der zerschnittenen Zellen. Die Atmung der Schnitte muss also entsprechend geringer sein. Die Grösse dieser Abweichung würde man jedoch kaum feststellen können.

Aus diesem Versuch ergibt sich, erstens, dass man den nor-

malen Atmungswert unter den in Versuch I gewählten Versuchsbedingungen bestimmen kann und zweitens, dass die Atmung der Kolbenspitze nicht gehemmt wird wegen einer zu geringen Diffusionsgeschwindigkeit des Sauerstoffs. Ich möchte noch bemerken, dass die Dicke der Schnitte nicht gross genug ist, um die O_2-Versorgung in Gefahr kommen zu lassen. Denn ein Vergleich der Atmungswerte dicker (± 2 mm) und dünner (± 0,7 mm) Schnitte ergab keinen Unterschied.

§ 9. Die Änderung der Atmung während der Entwicklung.

Im Versuch III ist die Atmungsintensität in verschiedener Höhe des Kolbenendes gemessen und wieder pro mgr. Trockensubstanz berechnet worden. Nur das gelbe Gewebe wird untersucht. Die Schnitte werden den Enden (in 2 cm Entfernung der Spitze und Basis) und der Mitte des sterilen Anhängsels entnommen. Doppeltbestimmungen werden gemacht: die Schnitte folgen dann unmittelbar aufeinander. Man darf die Atmungswerte der Teile eines selben Blütenkolbens direkt vergleichen; der Vergleich dieser Werte von verschiedenen Blütenkolben aber ist hier nicht gestattet, da die Pflanzen aus nicht-selektierten Knollen gezüchtet sind und die Messungen an verschiedenen Tagen stattfanden. Die Aussenbedingungen waren ungleich in Bezug auf die Temperatur, Feuchtigkeit, Sonnenbestrahlung, u.s.w. und diese Faktore haben u.U. einen ausschlaggebenden Einfluss auf die Atmungsintensität. So kann es uns nicht überraschen, dass grosse Differenzen zwischen den einzelnen Pflanzen auftreten.

In den Tabellen ist die Zeitdauer, die die Blütenkolben im Versuchsmoment noch von ihrer Öffnung entfernt waren, bezw. die Zeit nach ihrer maximalen Blüte, mit eingetragen. Im ersterwähnten Fall beziehen sich die Daten auf die Zeit, die eine möglichst ähnliche Knolle mit gleicher Appendix-Länge bis zum Öffnen ihres Kolbens braucht. Da die Aussenbedingungen im Gewächshaus stark variieren, haben diese Angaben nur einen orientierenden Wert.

Aus der Tabelle III geht hervor, dass die Atmung in allen Teilen des Anhängsels ungeöffneter Blütenkolben nahezu gleich intensiv ist. Die Differenzen sind nicht wichtig und wenig grösser als die zwischen den Kontrollbestimmungen. Ganz anders jedoch während der Blüte; dann treten starke Schwankungen auf. Immer beobachtete ich dabei, dass zuerst die Atmung im Spitzenteil intensiver ist als im übrigen Teil des Organs; später, etwa ein halber Tag nach der Entfaltung der Blüten, ist sie

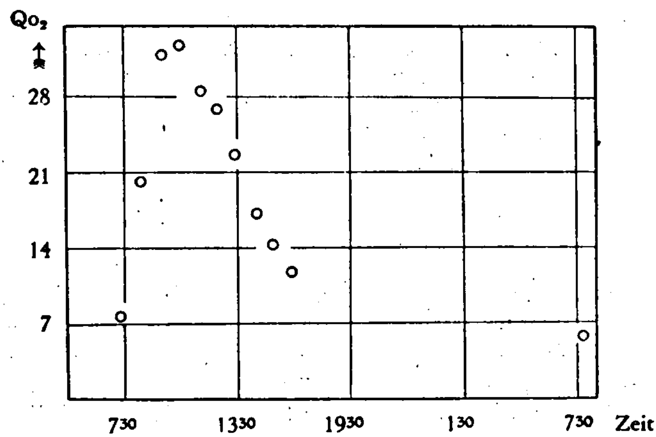
im mittleren-, oder im basalen Teil am stärksten. Der Teil mit der stärksten Wärme-Erzeugung hat auch die grösste Atmungsintensität. Nach etwa einem Tage werden die Differenzen kleiner, doch sind auch dann noch verhältnissmässig grosse und unregelmässige Schwankungen zu verzeichnen.

VERSUCH III.

Die Atmungsintensität des „gelben" Gewebes, in cmm O_2 pro mg Trockensubstanz und Stunde:

Appendix-Teil	Spitze	Mitte	Basis	Appendix-Länge mm
4 Tage vor der Öffnung	1,54 ; 1,59	1,47 ; 1,44	1,46 ; 1,46	125
4 Tage vor der Öffnung	1,73 ; 1,75	1,62 ; 1,65	1,72 ; 1,69	143
2 Tage vor der Öffnung	2,63 ; 2,54	2,50 ; 2,69	2,51 ; 2,53	274
Sofort nach der Öffnung (maximale Erwärmung an der Spitze)	34,0 ; 36,7	12,5 ; 13,0	9,4 ; 9,7	263
½ Tag nach der Öffnung (maximale Erwärmung im basalen Teil)	16,9 ; 17,9	21,6 ; 22,9	27,1 ; 28,5	250
1 Tag nach der Öffnung	2,7 ; 2,7	3,3 ; 3,1	4,1 ; 4,4	306
2 Tage nach der Öffnung	7,1 ; 6,8	8,4 ; 8,1	7,7 ; 7,9	298

VERSUCH IV.



Die Änderung der Atmungsintensität während der Erwärmung. Appendix-Spitze. Für jede Bestimmung wurde ein neuer Gewebeschnitt verwendet. Maximum der Erwärmung: 9—11 Uhr. (Gemessen wurde die O_2-Aufnahme in 30 Min).

Homogenes Atmungsmaterial erhält man also mit einem jungen, sich entwickelnden Appendix.

Während der Entwicklung ändert sich die Atmungsintensität. Das beweisen die Versuche IV und V.

Im Versuch IV wurde jede Stunde, die O_2-Aufnahme kleiner Teile der Spitze eines Kolbens, während 30 Min. gemessen. Die Schnittflächen der Appendix wurden mit Kakaobutter verschlossen und die neuen Probestückchen immer ± 2 mm unter der Schnittfläche entnommen. Die Gesamtlänge des untersuchten Teiles beträgt 7 cm (± $^1/_5$ Teil der ganzen Appendix). Die im Versuch III nachgewiesene Atmungsänderung kann das Resultat also nicht beeinflusst haben. Die Temp. des Gewächshauses beträgt ± 25°, die des Thermostaten 30°. Die Fehlergrösse zwischen den Kontrollbestimmungen beträgt etwa 6%.

Beim Anfang des Versuches ist der Kolben nicht geöffnet. Die Probe-Entnahme ändert weder die normale Entwicklung noch die Entfaltungsbewegung des Spathas. In wenigen Stunden ist der O_2-Verbrauch auf das 5-fache erhöht, bleibt während etwa einer Stunde konstant und nimmt dann plötzlich stark ab. Dieser Verlauf der Kurve stimmt mit den Untersuchungen von GARREAU für die Infloreszenz von Arum überein. Doch verläuft der Prozess schneller in unserem Beispiel. Die Form der Kurve ist stark abhängig von der Temperatur des Gewächshauses: bei niedriger Temperatur wird der ganze Prozess stark verzögert und ist die Aktivität der Atmungsenzyme entsprechend geringer.

Versuch V zeigt ebenfalls die plötzlich auftretende Atmungszu- und abnahme. Das Experiment unterscheidet sich darin vom vorigen, dass der Versuchsdauer sich über 9 Tage erstreckt und immer der Spitzenteil (etwa 1/6 Teil vom oberen Ende) verschiedener Kolben untersucht wird. Grosser Wert ist dann auf Homogenität des Pflanzenmaterials zu legen. Zuerst sind die Sauromatum-Knollen ihrer Grösse nach selektiert worden, und später, als der Spross etwa 8 cm hoch war, nochmals nach der Länge dieses Organs. So gelingt es relativ gleichförmiges Material zu erhalten. Die Pflanzen entwickeln sich gleichmässig; im Durchschnitt blühten von 10 Pflanzen etwa 7—8 am selben Tag, die andern blühten einen Tag früher oder später. Diese werden weiter nicht in der Versuchsserie untersucht. Die Übereinstimmung der Atmungswerte von Kontrollpflanzen ist genügend. Der Mittelwert der Abweichungen ist am grössten bei sich öffnenden Blütenkolben und beträgt etwa 50% [1]), vor diesem Zeitpunkt beträgt er ± 8%, danach 30%—10%. Diese Differenzen lassen sich kaum weiter herabdrücken. Beim Vergleich der

[1]) Nach Versuch IV treten diese Differenzen schon auf, wenn die Entfaltung einer Blüte um wenige Stunden verschoben ist!

VERSUCH V.

Die Atmungsintensität des Appendix-Gewebes (Spitzenteil).

Methode der Atmungsmessungen; siehe S. 88.

Die Pflanzen wurden erst nach möglichst guter Auswahl der Knollen (S. 92) für die Untersuchung verwendet. Die Atmung ist immer von zwei angrenzenden Stückchen des Anhängsels gemessen worden.

Entwicklungsstadium	Appendix-Länge mm	Die Atmung pro gr Trockensubstanz und Stunde ccm O_2
6 Tage vor Entfaltung der Blüten	121	1,6 ; 1,5
(25 - IV - 9)	127	1,6 ; 1,6
2 Tage vor Entfaltung der Blüten	256	2,2 ; 2,1
(29 - IV - 10)	279	2,3 ; 2,2
Entfaltung der Blüten	286	30,9 ; 31,3
(1 - V - 14,30)	298	34,5 ; 35,0
Optimum der Erwärmung	302	59,5 ; 57,9
(1 - V - 16,30)	316	37,4 ; 38,2
Nach 1 Tag	313	8,4 ; 8,6
(2 - V - 11)	296	6,3 ; 6,6
Nach 2 Tagen	306	4,6 ; 4,4
(3 - V - 11)	284	4,3 ; 4,2
Nach 3 Tagen	290	1,1
(4 - V - 10)	307	1,3

Zahlen muss man die Möglichkeit dieser Differenzen berücksichtigen.

Die Qo_2-Werte [1]) ganz junger Appendices unterscheiden sich wenig von den anderer Pflanzenteile. Während der Blütenperiode sind die Zahlen sehr hoch. Der Mittelwert aller Messungen (29 Kolben) beträgt dann 30; der höchste Atmungswert, den ich gemessen habe, war $Qo_2 = 68$.

Wachsende Pflanzenteile, keimende Samen, Blütenknospen, u.a. zeigen eine sehr energische Atmungstätigkeit. Extreme Werte findet man bei Mikro-Organismen: so bestimmte Warburg die maximale Atmung für Bäckerhefe in 1%-iger Zuckerlösung im Durchschnitt auf 75 cm 0_2 pro mgr Trockensubstanz und Stunde; für Essigbakterien, mit Alkohol als Substrat, war Qo_2 sogar 1000.

§ 10. Über die Genauigkeit der Messungen.

Die in diesem Abschnitt gegebenen Versuche stellen eine Er-

[1]) Qo_2 ist die Intensität der Atmung, gemessen in cmm O_2 pro Stunde und mgr Trockensubstanz.

weiterung der Experimente unserer ersten Mitteilung dar (46).

Aus diesen Versuchen ergibt sich, dass es beim Sauromatum grosse Schwierigkeiten bietet, homogenes Versuchsmaterial zu erhalten. Die Intensität, mit der die Stoffwechselvorgänge im Appendix verlaufen, hängt u.a. ab vom Entwicklungszustand, von den Aussenbedingungen und von der Grösse der Knollen. Auch schwankt sie noch in verschiedenen Teilen eines Kolbens, obschon ich immer die periphere Gewebeschicht zur Untersuchung verwendete. Handelt es sich um einen Vergleich der Intensität mehrerer Stoffwechselvorgänge, so müssen wir die Abweichungen, die von den genannten Faktoren allein schon hervorgerufen werden können, genau kennen.

Ich kann darüber folgendes bemerken:

a. Zwei kurze, benachbarte Appendix-Stückchen von etwa 70 mgr. Trockengewicht (± 10—20 mm Länge) zeigen nur geringe Unterschiede in ihrem physiologischen Verhalten. Die Versuchsresultate stimmen fast immer innerhalb der Messgenauigkeiten überein und man erhält keine grösseren Differenzen als etwa 5%. (vgl. die Kontrollmessungen der Versuche I, II und III).

b. Stammen die Gewebestückchen aus nicht benachbarten Teilen, so beobachtet man öfters (besonders in geöffneten Blütenkolben!) grosse Differenzen. Diese können teilweise eliminiert werden: der Kolben wird in 3 Stücken von etwa gleicher Länge geteilt und das gelbe Gewebe in 1 mm dünner Scheiben zerlegt. Das Frischgewicht jeder der 3 Portionen wird sofort bestimmt (Genauigkeit: 10 mgr.) und von jedem denselben Bruchteil gewählt. Diese Schnitte werden dann zusammengefügt, wie in I gewaschen, und so für die Untersuchung verwendet. Wählt man die Zahl der Schnitte jeder Portion nicht zu klein, so erhält man ein genügend homogenes Material. In einer Reihe von Kontrollbestimmungen unterschieden sich die Atmungs- und Kohlenhydratwerte, nach diesen Vorsorgen, um nicht mehr als 6%.

Diese Methode genügt nicht mit Blütenkolben, die sich gerade geöffnet haben. Man muss die Kolben zuerst in einem Teil mit der grössten, und in einem Teil mit der geringsten Wärmeproduktion teilen und jeden Teil für sich verarbeiten, wie oben angegeben worden ist.

Ich weise noch darauf hin, dass die Angaben über das Frischgewicht sich beziehen auf die nicht-gespüllten Gewebeschnitte, die der Trockensubstanz auf die gewaschenen Schnitte.

c. Vergleicht man die Stoffwechselvorgänge verschiedener

Kolben, und zu verschiedenen Zeitpunkten, so treten erst recht grosse Schwankungen auf! Ihren Einfluss könnte man verkleinern, wenn man den Mittelwert einer grossen Versuchsserie nehmen würde. Da uns eine genügende Materialmenge fehlte, war das niemals möglich. Mittels einen scharfen Auswahl der Knollen und Blüten, wie auf S. 92 beschrieben, konnte ich die Differenzen verkleinern. Diese Selektion ist, wenn nötig, in allen folgenden Versuchen ausgeführt worden.

V. DIE WÄHREND DES BLÜHENS IN DEN ANHÄNGSELN AUFTRETENDEN STOFFWECHSELVORGÄNGE.

§ 11. Der Atmungsquotient.

Wenden wir uns der Frage zu, welche Substanzen veratmet werden.

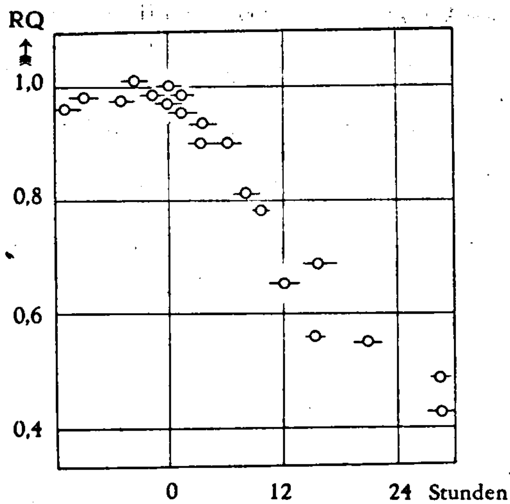
Die Grösse des respiratorischen Quotienten gibt dazu wichtige Andeutungen.

Zur Messung des Gasstoffwechsels wurden Apparate verwendet, die nach dem Prinzip der Thunbergschen Mikrorespirometer konstruiert waren. Sie weichen wenig von den Modifikationen von JOHANNSON und ALBACH ab; nur haben die Atmungsgefässe ein grösseres Volumen. Da man die Differenz der CO_2-Entwicklung und O_2-Aufnahme (die Volumänderung des Gases während der Atmung) und die CO_2-Aufnahme (aus der Volumverminderung nach Absorption der CO_2 durch Kalilauge) messen kann, lassen sich sowohl die Mengen des abgegebenen Kohlendioxyds, wie die des verbrauchten Sauerstoffs bestimmen. Der Umstand, dass man mit demselben Gewebestück die Grösse des RQ [1]) in einer Reihe aufeinanderfolgenden Messungen bestimmen kann, ist einer der Vorteile dieser Methode. Ich habe die Resultate dieser Methode noch mit denjenigen der einfachen manometrischen Messung mit Gewebeschnitten verglichen (Methode WARBURG) und dieselbe Werte erhalten.

Der Atmungsquotient von Appendixstücken aus nicht-geöffneten Blütenkolben ist praktisch = 1; die Messungen schwanken zwischen den Zahlen 0,94 und 1,01. Diese Differenzen sind wenig grösser als die, welche von den Messfehlern bedingt werden. Auch in nur ein wenig geöffneten Blütenkolben hat er noch diesen Wert, doch nimmt er ab, wenn die Wärme-Entwicklung und Atmungsintensität geringer werden. Der RQ sinkt langsam, bleibt längerer Zeit konstant auf ± 0,8 (Versuch VI), um nach etwa 2 Tagen schnell zu verringern (RQ = 0,7—0,5). Der Appendix stirbt ab und die Atmungsintensität ist sehr klein. Ich konnte bisweilen eine kleine Zunahme des RQ-Wertes feststellen, die so zu deuten sein muss, dass die Atmungsenzyme schneller vernichtet und unwirksam werden als die Gärungs-

[1]) RQ = der Atmungsquotient

VERSUCH VI.



Die Änderung der respiratorischen Quotienten (RQ) während der Erwärmung.
Zur Zeit O = Maximum der Erwärmung.

fermente. Zweifelsohne stellt das eine pathologische Erscheinung dar.

Der RQ hat nicht immer in allen Teilen des Anhängsels denselben Wert. Auch für diese Bestimmungen treffen die Bemerkungen des § 10 volkommen zu.

Die Grösse des RQ weist darauf hin, dass die Hauptmenge des Atmungsmaterials im Anfang Kohlehydrate sind, die bei der intensiven Verbrennung schnell veratmet werden. Später, wenn der RQ geringer wird, spielen vielleicht Eiweiszsubstanzen eine grössere Rolle bei der Verbrennung (§ 14).

§ 12. Die Kohlehydrat-Bestimmungen im Rindengewebe.

Im Versuch VII wurde die Menge der KH [1]), welche pro gr Trockensubstanz vorhanden sind, bestimmt. Die Proben wurden, nach scharfer Auswahl der Kolben, genommen.

Die KH-Bestimmung geschah in folgender Weise; teilweise nach Tollenaar und Lehmann. Das bei 80°—90° getrocknete Material wird gepulvert und quantitativ durch einen sehr feinen Sieb getrieben. Nach Trocknen wird eine bestimmte Menge abgewogen (± 100 mgr) und die löslichen KH mit Wasser extrahiert (3 Mal während 10 Min. bei 70°) unter Zusatz von etwas Bariumcarbonat).

Im Filtrat werden die Eiweiszsubstanzen nach Folin-Wu entfernt und in

[1]) KH = Kohlehydrate.

einem Teil der Lösung die Menge der direkt reduzierenden Substanzen nach Hagedorn-Jensen bestimmt. Diese Anfangsreduktion (A) erfasst die Glucose, die Fruktose, einen Teil der Maltose (die Eigenreduktion), die reduzierenden Nichtzucker u.a. Nach Hydrolyse der Saccharose während 5 Min. mit 2%-iger Salzsäure im Wasserbade (70°) und nach folgender exakten Neutralisation, wird der Reduktionswert B bestimmt; aus der Differenz B-A ergibt sich die Saccharose-Menge. Ein dritter Teil wird 24 Stunden lang mit 2½%-HCl invertiert (bei 70°). Die Zunahme des Reduktionswertes B-C ist auf Rechnung der Maltose zu stellen. Da Maltose eine beträchtliche Eigenreduktion hat, habe ich, nach TOLLENAAR, an reinen Maltose-Lösungen, diesen Wert und seine Vermehrung, mittels Inversion bestimmt. So erhält man eine empirische Tabelle der Maltose-Reduktionswerte und kann aus dem Wert C-B auf die ursprünglich vorhandene Maltose-Menge geschlossen werden. Daraus kann wieder die Gesamtmenge Glucose, Fruktose und nichtreduzierender Zucker berechnet werden. Da es sich zeigte, dass diese Menge sehr klein war, habe ich keine weitere Differenzierung vorgenommen und sie in der Tabelle als Monosen zusammengefasst.

Die Stärke befindet sich im Rückstand des filtrierten Pflanzenextraktes. Dieser wird mit dem Filterscheibe 1 Stunde lang im Autoklaven (4 Atm.) erhitzt, und 24 Stunden mit einer Taka-Diastase-Lösung unter Zusatz von etwas Toluol, als Antiseptikum, hydrolisiert. Nach Entfernung der Eiweiszsubstanzen wird der Reduktionswert nach HAGEDORN-JENSEN bestimmt. Die Eigenreduktion der Filterscheibchen, Taka-Diastase und Toluol werden in Kontroll-Bestimmungen gemessen und in Rechnung gesetzt.

Die Saccharose-, Maltose- und Stärke-Mengen sind in Glucose-Werte ausgedrückt worden.

Keine KH-Bestimmungsmethode, mit pflänzlichem Material, ist einwandfrei, doch man erhält durch diese Methode in Kontrollbestimmungen genügend konstante Werte. Vor allem ist darauf zu achten, dass das Material sehr fein zerrieben sein muss.

Es ergibt sich (Versuch VII), dass in ganz jungen Anhängseln schon eine grosse Menge KH vorhanden ist. Diese Menge nimmt nicht nur absolut (durch die Gewichtszunahme des Anhängsels während der Entwicklung), sondern auch relativ zu, so dass im Moment wo der Kolben geöffnet wird, im hier erwähnten Beispiel, die Gesammtmenge der KH 28% der Trockensubstanz ist. Der Monose-Gehalt ist niedrig, während Saccharose und Maltose ungefähr in gleichen Mengen vorhanden sind (ihre Summe ist etwa 28% der gesammten Menge). Die nicht-löslichen KH sind zu 71% anwesend. Gleich nach dem Öffnen des Blüten-Kolbens nimmt die Quantität nicht-löslicher KH stark ab, während die Mengen der löslichen Zuckern sich anfangs nur wenig ändern. Zu diesem Zietpunkt ist der RQ noch fast 1. In wenigen Stunden ist die KH-Menge stark vermindert un beträgt einige Prozente der Trockensubstanz. Nach etwa einem Tag bleibt nur wenig übrig.

Ich bemerke hierzu, dass die wirklich stattgefundene Abnahme der KH grösser ist, als die in der Tabelle wiedergegebene, da

ich alles auf das Trockengewicht bezogen habe. Es leuchtet ein, dass mit der starken KH-Abnahme auch eine korrespondierende Verringerung der Trockensubstanz parallel geht. Wegen des, anfänglich, grossen KH-Gehalts ist diese Veränderung unserer Bezugsgrösse nicht zu vernachlässigen. Denn, würde die Menge aller anderen Substanzen sich nicht ändern, so würde bei der maximalen Atmung ($Qo_2 = 30$) pro Stunde und gr Tockensubstanz 40 mgr KH verbrannt werden, d.h. 4% der Trockensubstanz. Unter Zugrundelegung dieser Grösse als Massstab, würden alle Werte pro Stunde um diesen Betrag zu hoch gemessen sein! Ich habe deshalb in der Tabelle auch die totale Menge der, in den untersuchten Kolben vorhandenen KH eingetragen, da der genannte Fehler dann nicht besteht.

VERSUCH VII.

KH Bestimmungen im „gelben" Gewebe.

Die Intensität der Atmung ist jedesmal von etwa 1 gr (Frischgewicht) des Materials bestimmt worden und für die Gesamtmenge des Gewebes errechnet (Doppeltbestimmung). (Die Werte stellen aus mehreren Analysen errechnete Mittelwerte dar).

Entwicklungsstadium	Appendix-Länge (mm)	Frischgewicht des Rindengewebes (gr)	Trockengewicht des Rindengewebes (mgr)	Atmung ccm O_2/Stunde	Berechnet pro 100 mgr Trockensubstanz mgr „Glucose"				Im Rindegewebe eines Kolbens vorhanden mgr „Glucose"			
					Monosen	Saccharose	Maltose	Stärke	Monosen	Saccharose	Maltose	Stärke
1) 6 Tage vor Entfaltung der Blüten	110	3,0	520	0,6	0,7	1,11	0.75	4,2	3,6	5,8	3,9	21,8
	115	3,1	542	0,7	0,6	1,26	0,81	5,3	3,2	7,3	4,4	28,7
2) 1 Tag vor Entfaltung der Blüten	324	14,9	2810	11,0	0.3	2,11	0,72	21,4	8	59	20	600
	339	14,6	2730	10,3	0,3	2,32	0,88	22,7	8	64	24	620
3) Entfaltung der Blüten	346	15,8	1810	48,6	0,1 ?	3,34	4,35	19,9	2 ?	61	79	360
	331	15,7	2050	55,3	0,1 ?	3,21	4,00	21,4	2 ?	70	82	438
4) 24 Stunden später	340	15,3	1520	9,1	0,1	0,43	0,33	0,47	2	6,5	5,0	7,1 [1])
	322	13,1	1260	7,0	0,07	0,63	0,29	0,37	0,9	7.9	3,7	4,7 [1])
5) 2 Tage nach Entfaltung der Blüten	296	11,6	832	12,1	0,08	?	?	0	0,7	?	?	0
	323	12,1	880	9,3	0,04	?	?	0	0,4	?	?	0

[1]) Diese KH-Menge entspricht etwa 15 ccm O_2.

Wenn die O_2-Aufnahme am grössten ist, nimmt der KH-Gehalt am stärksten ab. Das weist darauf hin, dass bei der Atmung KH verbrannt werden. Welcher Bruchteil der ganzen Atmung ist einer KH-Veratmung zuzuschreiben? Die Frage ist experimentell am leichtesten zu untersuchen, wenn wir die Messungen mit abgeschnittenen Appendix-Stücken ausführen.

Man wählt für die Untersuchung den Teil eines Anhängsels, von welchem man erwarten könnte, dass die Stoffwechselreaktionen in allen Zellen mit annähernd gleicher Intensität verlaufen, z.B. das Stück mit gleicher Wärme-Entwicklung. Wie immer, verwendet man nur die gelbgefärbte Gewebeschicht. Sofort werden die KH-Mengen im oberen und unteren Viertel des Materials bestimmt. Der O_2-Verbrauch des mittleren Teils wird während einiger Stunden gemessen und danach wiederholt man die KH-Bestimmungen. Als Bezugsgrösse verwendete ich das Frischgewicht, am Anfang der Untersuchung. In dieser Weise kann man den KH-Verbrauch mit der O_2-Aufnahme vergleichen (Versuch VIII). Ein Kontrollversuch hatte gezeigt, dass mit dieser Untersuchungsmethode, die KH-Werte von zwei Appendix-Stücken wenig variieren (vgl. Versuch VIII, A).

Das Ergebnis lässt sich leicht an der Hand der Tabelle übersehen. In Versuch VIII, B beobachtet man eine grosse KH-Abnahme und eine starke Atmung. Der zuerstgenannte Wert entspricht 31,1 mgr Glucose. Die Oxydation von 1 mgr Glucose erfordert die Aufnahme von 750 cmm O_2. Zur vollständigen Verbrennung der verschwundenen KH-Menge brauchte die Pflanze 23,3 ccm O_2, oder 87% des ganzen Atmungswertes. Es bedeutet, dass in diesem Entwicklungsstadium praktisch nur KH veratmet werden.

VERSUCH VIII.

Die Beziehung zwischen der Atmung und der Veränderung in der Zusammensetzung der Trockensubstanz der Anhängsel.

Ich untersuchte den Teil der Appendix-Spitzen, der nur die gelbgefärbte Gewebeschicht enthält.

Atmungsmessungen und KH-Bestimmungen an abgeschnittenen Gewebestücken.

A, B, und C: verschiedene Blütenkolben.

A und B: der Kolben ist kaum entfaltet
C : 2 Tage nach der Entfaltung

I: der obere und untere Viertel des untersuchten Teils des Anhängsels
II: der mittlere Teil.

A.

Der Versuch zeigt, dass die KH-Werte in I und II genügend übereinstimmen.

I: Frischgewicht 1,93 gr.
Trockensubstanz 201,5 mgr oder 10,4% des Frischgewichts.

Monosen	0,4 mgr.	oder	0,2%	der Trockensubstanz
Saccharose	6,9 „		3,4%	„ „
Maltose	8,3 „		4,1%	„ „
Stärke	39,6 „		19,6%	„ „

II: Frischgewicht 3,29 gr.
Trockensubstanz 346,7 mgr oder 10,6% des Frischgewichts

Monosen	0,1 mgr	oder	0,03?%	der Trockensubstanz
Saccharose	11,3 „		3,3 %	„ „
Maltose	15,9 „		4,6 %	„ „
Stärke	69,9 „		20,2 %	„ „

B.

I wird sofort untersucht

II atmet 8 Stunden und wird danach untersucht.

I: Frischgewicht 2,94 gr.
Trockensubstanz 382,2 mgr.

		Berechnet pro 2,35 g Frischgewicht: 305,5 mgr
Monosen	1,2 mgr	0,95 „
Saccharose	13,0 „	10,3 „
Maltose	16,1 „	12,7 „
Stärke	84,5 „	66,8 „

Der Gesamtgehalt an Kohlehydrate beträgt 90,7 mgr

II: Frischgewicht 2,35 gr (am Anfang des Versuchs)
Trockensubstanz 265,1 mgr (am Ende des Versuchs)

O_2-Aufnahme nach 120 Min .... 11,6 ccm
„ 240 „ .... 19,0 „
„ 360 „ .... 23,3 „
„ 480 „ .... 26,7 „ (entspricht 35,6 mgr „Glucose")

Analyse am Ende des Versuchs:

Monosen	0,7 mgr
Saccharose	7,4 „
Maltose	14,9 „
Stärke	36,6 „

Der Gesamtgehalt an Kohlehydrate nach 8 Stunden beträgt 59,6 mgr „Glucose"

C.

I wird sofort untersucht

II atmet 24 Stunden

I: Frischgewicht 3,11 gr
Trockensubstanz 519,4 mgr

		Berechnet pro 2,44 gr Frischgewicht: 407 mgr
Monosen	1,5 mgr	1,2 mgr
Saccharose	2,24 „	1,7 „
Maltose	3,3 „	2,6 „
Stärke	1,4 „	1,1 „

Der Gesamtgehalt an Kohlehydrate beträgt: 6,6 mgr

II: Frischgewicht am Anfang des Versuchs: 2,44 gr
Trockensubstanz (nach 24 Stunden): 393,7 mgr
O_2-Aufnahme während 24 Stunden: 7,3 ccm (entspricht 9,6 mgr „Glucose")

Monosen	1,3 mgr
Saccharose	0,83 „
Maltose	1,0 „
Stärke	0,7 „

Der Gesamtgehalt an Kohlehydrate beträgt 3,8 mgr „Glucose" nach 24 Stunden.

Anders jedoch zwei Tage später (C). Die Atmung und der KH-Verbrauch sind viel geringer. Berechnet man wieder den Bruchteil, der die KH-Verbrennung von der ganzen Atmung ausmacht, so erhält man den niedrigen Wert von ± 30%. Das Ergebnis stimmt mit denen der vorigen Versuche überein, und weist darauf hin, dass in späteren Stadien nur wenige KH veratmet werden, und um so mehr andere Stoffe. Ich habe den Versuch nur ein Mal ausgeführt. Jedoch weist das Resultat von VII ebenfalls in dieser Richtung hin.

Eine Wanderung der KH wurde nicht berücksichtigt. Vor dem Aufblühen besteht ein Saftstrom, gerichtet von den Knollen zum Appendix. Ob dieser Stoffstrom auch später bleibt, ist nicht bekannt (s. auch S. 104). Sollte man diese Annahme machen, so wäre in intakten Organen die veratmete KH-Menge grösser als die Menge, die in isolierten Stücken oxydiert wird. Ich möchte jedoch bemerken, dass die Geschwindigkeit, mit welcher der Saftstrom in der Richtung des Anhängsels statt finden sollte, sehr gross sein müsste, um unsere Schlussfolgerung prizipiell zu ändern.

Das Problem der KH-Wanderung wäre zu lösen durch KH-Bestimmungen im Appendix und im übrigen Teil der Pflanze. Experimentell zeigte sich bald, dass eine Lösung in dieser Richtung nicht möglich ist, da die Schwankungen in den KH-Mengen der verschiedenen Teile der Pflanzen viel grösser sind als die, welche von der KH-Wanderung hervorgerufen werden können.

§ 13. Die KH-Bestimmungen im Markgewebe.

Die Trennung und Bestimmung der Kohlehydrate wurde nach dem üblichen Verfahren ausgeführt. (S. 97). Die Anfangsreduktion des Extraktes aus dem Markgewebe ist gross; deshalb bereitet die Bestimmung der reduzierenden Nichtzucker nach Vergärung der Zucker hier keine Schwierigkeit. Dabei setzen wir voraus, dass die nicht gärfähigen Substanzen durch die verarmte Bräuerei-Hefe in ihrem Reduktionswert nicht verändert werden. Es ergab sich, dass die sog. Restreduktion den grösseren Teil des Gesamtreduktionswertes ausmachen kann. Die Zahlen der Spalten 6, 10 und 12

(Versuch IX) sind um diesen Betrag korrigiert worden; sie stellen also den Monosenwert dar (Glucose, Fruktose und Pentosen(?)).

Woher diese grosse Restreduktion (Spalte 14) stammt, ist nicht bekannt; vielleicht wird sie hervorgerufen von den reichlich vorhandenen schleimigen Substanzen.

Im zentralen Gewebe befindet sich viel Glucose, sehr wenig Saccharose und keine Maltose oder Stärke. Die gemessenen Saccharose-Werte übertreffen die Versuchsfehler nur einige Male, da das Extrakt wegen der grossen Restreduktion nach starker Verdünnung untersucht werden musste. Die Saccharose-Messungen sind also ziemlich ungenau. Die Glucose-Menge (fast die ganze KH-Menge) nimmt vor der Entfaltung der Blütenkolben zu, und sinkt später schnell ab.

Während wir die KH-Abnahme im Rindengewebe auf die intensiv verlaufenden Atmungsprozesse zurückführen konnten, trifft diese Erklärung für das Markgewebe nicht zu. Im Versuch I wurde seine Atmungsintensität gemessen; ich habe diese Messungen, für das Material in Versuch IX untersucht, nicht wiederholt. Die grösste gemessene Atmungsgeschwindigkeit in Markzellen war 2,1 ccm O_2/Stunde/gr Trockensubstanz (während der Blütenperiode). Ich setze in der folgenden Berechnung voraus, dass das Gewebe diese Geschwindigkeit während einiger Tage behält. Das entspricht nicht den Tatsachen, da seine Atmung abnimmt. Wählen wir doch den genannten Höchstwert, so würden die Zellen in 24 Stunden 50 ccm O_2 oder 67 mgr Glucose veratmen (pro gr Trockensubstanz). Ich habe Grund zur Annahme, dass dieser Wert gewiss nicht überschritten wird. Die tatsächlich gemessene KH-Abnahme beträgt 272 — 85 = 187 mgr Glucose/gr Trockensubstanz. (Die Differenz der Zeilen 3 und 4). Dieser Wert stellt einen mindest Wert dar, da das Trockengewicht während der Blütenzeit abnimmt; ein Gramm Trockensubstanz ist am Ende des Versuches ein grösserer Teil des Anhangs, als im Anfang. Die KH-Abnahme ist also mindestens das 2,7-fache des Wertes, den wir aus den Atmungsmessungen berechnet haben.

Der Versuch zeigt, dass nur ein Teil der Kohlehydraten des Markgewebes durch einen Atmungsprozess entfernt werden. Der übrige Teil (64% der Gesamtmenge) verschwindet durch eine Stoffwanderung.

Ob ausserdem noch KH aus der Knolle dem weissen Gewebe zugeführt worden sind, wurde in dieser Berechnung nicht berücksichtigt.

Die Zu- und Abnahme der KH im Markgewebe verläuft fast parallel den Änderungen im Rindengewebe. Es fällt sofort auf,

VERSUCH IX.

KH-Bestimmung im Markgewebe.

(Die Werte stellen aus mehreren Analysen errechnete Mittelwerte dar)

Entwicklungsstadium	Anzahl der untersuchten Kolben	Appendix-Länge (m m)	Frischgewicht des Markgewebes (gr)	Trockengewicht des Markgewebes (mgr)	Berechnet pro gr Frischgewicht mgr „Glucose"				Berechnet pro 100 mgr Trockensubstanz mgr „Glucose"		Im Markgewebe eines Kolbens vorhanden mgr „Glucose"		
					Monosen	Saccharose	Maltose	Stärke	Monosen	Saccharose	Monosen	Saccharose	Restreduktion (reduzierende Nicht-Zucker)
1. fortschreitender Wachstum der Spatha 4 Tage vor Entfaltung der Blüten	3	125 143 162	3,18	152	13,2	0	0	0	27,6	0	14	0	4,4
2. 2 Tage vor Entfaltung der Blüten	2	230 274	3,77	161	11,9	?	0	0	27,7	0,5?	22,4	0,4?	8,5
	2	275 263	4,23	192	13,2	0	0	0	29,0	0	27,8	0	9,8
3. Entfaltung der Blüten (Anfang)	3	250 280 286	Spitze 1,98 5,10 Basis 3,12	309	16,5 {17,9 15,6}	1,2 {1,4 1,1}	0	0	27,2	2	28,1	2,1	10,5
4. 24 Stunden später	3	290 302 306	3,25	249	6,5	0 0	0	0	8,5	0	7,1	0	10,7
5. 2 Tage nach Entfaltung der Blüten	2	298 313	1,85	182	4,9	1,4	0	0	4,9	1,4	4,5	1,3	12,2

dass das Mengenverhältnis der Mono- und Disacchariden und der Stärke in beiden Schichten so verschieden ist. Während in der Rinde sehr wenig Monosen und viele anderen KH vorhanden sind, liegt gerade im Mark der umgekehrte Fall vor.

Ich möchte diese Erscheinungen in folgender Weise zu erklären versuchen: das Verbrennungsmaterial wandert (vielleicht nur teilweise) von der Knolle durch das Markgewebe zu der Rinde. Der zentrale Teil des Anhängsels enthält nur die Transport-KH (Glucose), die im peripheren Teil als Di- und Polysacchariden angehäuft werden. Während der Entfaltung der Blütenkolben werden diese Reservestoffe schnell mobilisiert und veratmet.

Trifft die Erklärung zu, so würde im normalen Kolben, auch während der Periode der intensivsten Atmung, dem gelben Gewebe immer noch Verbrennungsmaterial zugeführt werden. Man darf dann die Ergebnisse der Versuche an der isolierten Rindenschicht gewonnen, nicht auf die intakte Pflanze übertragen.

§ 14. Eiweissbestimmungen im Rindengewebe.

Da am Ende der Blütenzeit die Grösse des Atmungsquotienten sinkt und die Kohlehydrate fast völlig verschwunden sind, fragt es sich, ob in diesem Entwicklungsstadium, eine Eiweissveratmung nachweisbar wäre. Ich habe diese Frage noch nicht eingehend untersucht und möchte hier nur kurz über einige Eiweissbestimmungen im gelben Gewebe berichten.

Der gesamte-, Eiweiss- und lösliche Stickstoff wurde nach der Mikro-Kjeldahlmethode bestimmt. Ich benutze Natriumwolframat, nach Folin und Wu, zur Trennung der löslichen und nicht-löslichen Stickstofffraktion. Die Ammoniak-Bestimmung geschah durch Vakuum-Destillation mit Borax, unter Vorlegung von $^1/_{50}$n Schwefelsäure und Rücktitration mit $^1/_{50}$n Lauge.

Wie aus dem Versuch X ersichtlich ist, wird der N-Gehalt pro Gramm Trockensubstanz sofort nach der Entfaltung der Blüte, grösser. Erklärlich ist diese Zunahme, wenn man erwägt, dass durch die intensive Atmung die KH-Menge im Appendix sich stark verringert und infolgedessen die relativen Mengen der Eiweiss- und anderen Fraktionen steigen. Ganz anders verhält sich die Pflanze 2 Tage später: immer werden noch feste Substanzen verbraucht und nimmt die Gesamtmenge der N-haltigen Substanzen zu, — obschon in geringerem Masse —, doch beobachtet man eine Eiweissabnahme. Daraus geht hervor, dass nicht nur die relativen, sondern auch die absoluten Mengen der Eiweisskörper abnehmen.

VERSUCH X.

N-Bestimmungen im peripheren Gewebe. (mgr N in 50 mgr Trockensubstanz). (Die Werte stellen aus 2 Analysen errechnete Mittelwerte dar; verwendet wurde 1 Appendix).

Entwicklungsstadium	Eiweiss-N	Löslicher-N (kein NH_3-N)	NH_3-N	Gesamt Stickstoff
3 Tage vor Entfaltung der Blüten	1,48	0,081	0,028	1,59
Kurze Zeit vor maximum der Erwärmung	1,09	0,063	0,021	1,15
Einige Stunden nach dem Maximum der Erwärmung	1,22	0,088	0,023	1,33
24 Stunden später	1,42	0,348	0,030	1,80
48 Stunden später	1,31	0,515	0,097	1,92

Der Versuch erbringt nicht den Beweis, dass Eiweiszsubstanzen veratmet werden; sie könnten auch mittels einer hydrolytischen Spaltung entfernt werden. Die Verteilung der Substanzen, die die Fraktion des löslichen-Stickstoffs bilden, muss näher untersucht werden. Die Ammoniak-Bestimmungen weisen aber auf eine Veratmung der Eiweisskörper hin.

§ 15. Über die Aktivitätsänderung der Atmungsfermente.

Während der Entwicklung ändert sich nicht nur die Intensität, mit welcher die Verbrennungsreaktionen in den Zellen verlaufen, sondern auch die Natur dieser Reaktionen bleibt nicht konstant; zuerst veratmet der Appendix Kohlehydrate, später wäre eine geringe Eiweissveratmung möglich. Werden diese Änderungen allein bedingt durch die Mengen der vorhandenen Atmungssubstanzen oder liegt hier ausserdem noch eine Aktivitätswechsel der Enzyme zugrunde?

Die Atmung vieler pflanzenlichen Zellen ist nicht maximal; die in aktiver Form vorhandenen Enzyme können ihre Wirkung nicht entfalten, wegen eines Mangels an den Verbrennungskörpern, auf welche sie spezifisch eingestellt sind. Jede Schwankung ihrer Aktivität wird nur nachweisbar, nachdem man durch Zusatz dieser Substanz ihr Umsatzgeschwindigkeit auf den höchsten Wert gesteigert hat.

Aus dem Versuch XI geht hervor, dass die Menge des At-

mungsmaterials vor und während des Höhenpunktes der Atmung nicht die Geschwindigkeit der Reaktionen bedingen kann, weil sie nicht auf den Zusatz dieser Substanzen reagiert. Nimmt die Atmung später ab, so erzeugen Glucose, Hexosemono- und di-phosphorsaures-Na eine Erhöhung der O_2-Aufnahme. Sie erreicht aber nie den ursprünglichen Wert. Der Versuch beweist, dass die grosse Atmungsschwankung hauptsächlich bedingt wird durch Änderungen der Enzymaktivität, doch dass die Atmungskurve stärker abfällt, wegen eines Mangels an Verbrennungssubstanzen.

Man könnte das Ergebnis noch anders erklären. Wäre die Permeabilität des Gewebes für die untersuchten Substanzen gering, so bliebe ihre Menge in den Zellen klein, trotz der grösseren Konzentration in der Flüssigkeit; folglich würde die Atmung nicht steigern. Der Versuch XI würde dann nicht beweisen, dass das Atmungsferment gesättigt ist.

Diese Annahme trifft nicht zu (Versuch XII). Vergleichen wir die O_2-Aufnahme dünner, gewaschener Gewebestückchen und fein zerriebener Zellen (XII, A). Beim Zerreiben hielt ich die Temperatur durch starke Abkühlung in einer Kältemischung sehr niedrig, da bekanntlich die Enzymwirkungen in zerquetsch-

VERSUCH XI.

Die Sättigung des Atmungsfermentes.

Material: dünne Gewebeschnitte. (vgl. § 10) in 1,7 ccm m/20 Phosphatpuffer pH = 6,4.
Atmungsmessung nach Warburg (cmm O_2).

A. Kurze Zeit vor dem Aufblühen.
I: 670 mgr Frischgewicht.
II: 776 mgr Frischgewicht.

Zeit in Min.	I 0,3 ccm Wasser k_{O_2} = 1,76		II 0,3 ccm einer 5%-igen Lösung von Hexosemono- und diphosphorsaurem-Na. k_{O_2} = 1,50	
	Gemessen	Berechnet auf 100 mgr Frischgewicht	Gemessen	Berechnet auf 100 mgr Frischgewicht
5	30	4,5	42	5,4
10	65	9,7	83	10,7
20	128	19,1	157	20,2
30	189	28,2	223	28,7

B. Während der Entfaltung (Optimum der Wärmeproduktion)
I: 76 mgr Frischgewicht (8,7 mgr Trockensubstanz)
II: 70 mgr Frischgewicht (7,8 mgr Trockensubstanz)

Zeit in Min.	I 0,3 ccm Wasser ko_2 = 1,30		II 0,3 ccm einer 5%-igen Lösung von Hexosemono- und diphosphorsaurem-Na ko_2 = 1,23	
	Gemessen	Berechnet auf 100 mgr Frischgewicht	Gemessen	Berechnet auf 100 mgr Frischgewicht
10	28	44	24	34
20	53	70	47	67
30	79	104	68	97
40	103	136	90	129
	Qo_2 = 17,8		Qo_2 = 17,3	

C. Etwa 6 Stunden nach dem Aufblühen.
I: 450 mgr Frischgewicht.
II: 219 mgr Frischgewicht (26,5 mgr Trockensubstanz).

Zeit in Min.	I 0,3 ccm Wasser ko_2 = 1,78		II 0,3 ccm einer 5%-igen Lösung von Hexosemono- und diphosphorsaurem-Na ko_2 = 1,53	
	Gemessen	Berechnet auf 100 mgr Frischgewicht	Gemessen	Berechnet auf 100 mgr Frischgewicht
10	47	10	39	18
20	92	20	75	34
30	143	32	114	52
40	190	42	150	69
			Qo_2 = 8,5	

ten Zellen schon bei 20° — 30° rasch abnehmen. Der Gewebebrei wird quantitativ im Warburg-Gefäss übergeführt und die Atmung mit Zusatz eines Phosphatpuffers (pH = 6,8) gemessen. Anfangs wird der O_2-Verbrauch durch das Zerreiben fast nicht beeinflusst. Die Abnahme beträgt 10—17% [1]).

[1]) Da die Oxydationsgeschwindigkeit von den Konzentrationen der reagierenden Bestandteile abhängig ist, darf man zum zerriebenen Gewebe fast keine Flüssigkeit hinzufügen.

Zuerst langsam, später rascher (etwa eine Stunde nach dem Versuchsanfang) nimmt die O_2-Aufnahme ab. Das Präparat ist nur während kurzer Zeit wirksam; diese Zeitdauer ist starken Schwankungen unterworfen. In 2—2½ Stunden ist die Aktivität meistens auf 10—20% der Anfangswerte gesunken. Man erhält um so höhere Oxydationswerte, je niedriger die Temperatur beim Zerreiben des Gewebes ist. Auch darf die Temperatur des Thermostaten vom Warburg-Apparat nicht über 20°—25° steigen.

Fügt man ein Gemisch von Hexosemono- und diphosphorsaurem-Na zu den Atmungsgefässen hinzu, so bleibt die O_2-Aufnahme nicht nur mit den Gewebeschnitten, sondern auch mit dem Gewebebrei konstant. (vgl. Ansätze I und II; III und IV).

In Versuch XII, A habe ich die Spitze eines kaum geöffneten Kolbens untersucht; in XII, B verwendete ich, einen Tag später, den mittleren Teil von diesem Appendix. Ich erhielt dasselbe Resultat wie im Versuch A. Das Atmungsferment war jetzt ungesättigt. Die Zunahme des O_2-Verbrauchs nach Zusatz von Hexosediphosphorsaurem-Na ist mit den Gewebeschnitten und dem Gewebebrei gleich gross. Die Intensität der Verbrennungs-

VERSUCH XII.

Der Sättigungsgrad des Atmungsfermentes in intakten Zellen und im zerriebenen Gewebe (Rindengewebe).

I und II Gewebeschnitte in Phosphatpuffer pH = 6.8
III und IV Gewebeschnitte, fein zerrieben in Phosphatpuffer pH = 6,8

Zu II und IV wird eine Lösung von Hexosemono- und diphosphorsaurem-Na hinzugefügt (Endkonzentration 0,8%).
Die Gefässe werden 20 Min. vor der ersten Ablesung im Thermostat geschüttelt.
Die Zahlen stellen die O_2-Aufnahme in cmm dar, berechnet auf 50 mgr Frischgewicht des Gewebes in A und berechnet auf 200 mgr Frischgewicht in B.

A. Der Blütenkolben ist kaum entfaltet. Spitze.

Zeit in Min.	I	II	III	IV
10	27	24	23	25
20	53	49	47	49
30	83	73	69	72
40	106	97	88	93
70	186	170	131	143

B. Ungefähr ½ Tag nach der optimalen Wärme-Entwicklung. Mitte.

Zeit in Min.	I	II	III	IV
10	23	37	21	37
20	41	79	37	69
30	62	117	58	109
40	81	150	71	137
70	156	241	107	216

reaktionen wurde durch das Zerreiben um 12 Prozent verringert, sie nimmt durch die Fermentsättigung um 93% zu, doch bleibt dann wieder 9% hinter dem Wert, den man im Kontrollversuch mit den Gewebeschnitten erreicht, zurück.

Der Versuch beweist, dass die Permeabilität der Zellen genügend gross ist. Nach Zusatz der untersuchten Substanzen wird das Atmungsferment, auch bei den Gewebeschnitten, immer gesättigt.

Lässt man die Blütenkolben sich entwickeln bei relativ niedriger Temperatur, so verlängert sich die Entwicklungszeit stark. Bringt man die Knollen dann im warmen Gewächshaus, so blühen sie schnell auf. Ich konnte nach dieser Behandlung einige Malen beobachten, dass schon beim Öffnen der Kolben das Atmungsferment ungesättigt war. Wir werden es so erklären müssen, dass entweder ein grosser Teil der KH während der Entwicklungszeit veratmet wurde, oder die KH-Zufuhr aus den Knollen gehemmt war. Auch die Menge der Atmungsenzyme kann bei niedriger Temperatur geringer sein, als bei höherer, was sich ergibt aus den kleinen Q_{O_2}-Werten, die man unter diesen Bedingungen, nach Sättigung der Atmungsfermente, erhält.

Ob die Aktivität der Atmungsfermente oder die Menge des Atmungsmaterials die Geschwindigkeit der Verbrennungsreaktionen bedingt, hängt von vielen Faktoren ab: von der Entwicklungszeit, der Grösse der Knollen, der Temperatur und Feuchtigkeit des Gewächshauses, u.a. Ich habe die Pflanzen unter den günstigsten Bedingungen wachsen lassen (Temp. des Gewächshauses 24°—30°; relativ hoher Feuchtigkeit) und erhielt dann die in Versuch XII erwähnten Resultate.

VI. DIE ATMUNGS-CO-FERMENTE.

§ 16. Die Grundversuche.

Es ist von besonderem Interesse nach den Enzymsystemen zu suchen, welche die Verbrennungsreaktionen im Sauromatum-Kolben verursachen. Dabei beschränkte ich mich auf die Kohlehydrat-oxydierenden Systeme.

Die oxydierenden und dehydrierenden Fermente sind die labilsten Biokatalysatoren, die wir kennen. Auch wenn es gelingt sie aus der Zelle frei zu machen, wird die nachfolgende Untersuchung durch die geringe Haltbarkeit der Enzymlösung und den dabei auftretenden Aktivitätsverlust beeinträchtigt. Ausserdem können Absorptionserscheinungen an den Zelloberflächen und die Permeabilität der Zellmembranen die Umsätze am Ferment in einem solchen Masse beeinflussen, dass wir die gewonnenen Befunde mit losgelöstem Enzym nicht sofort auf das System der lebenden Zelle übertragen dürfen.

Die Oxydation des Verbrennungsmaterials kann von mehreren Enzymsystemen hervorgerufen werden. Der Nachweis, dass alle Komponenten eines solchen Systems in einer Zelle vorhanden sind, genügt nicht um den Oxydationsmechanismus, der in einem bestimmten Moment in diesen Zellen stattfindet, zu erklären (vgl. § 6).

So gewinnt, für jedes isolierte Oxydationssystem, die Frage an Bedeutung: welche Rolle spielt das Ferment im normalen Atmungsvorgang? Ich werde diese Frage in den folgenden Abschnitten im Vordergrund stellen.

Es gelang mir nachzuweisen, dass die Aktivität der Atmungsfermente auf das Zusammenwirken mehrerer Faktoren zurückzuführen ist. (Versuch XIII).

Das Gewebe wird unter starker Abkühlung mittels einer Kältemischung mit kleinen Eisstückchen fein zerrieben und bei niedriger Temperatur, während einigen Minuten, bei geringer Tourenzahl zentrifugiert. So gelingt eine rohe Trennung zwischen den Zellwänden und einer trüben, gelbgefärbten Flüssigkeit. Der Rückstand wird wieder mit Eis verrieben und zentrifugiert; er ist dann hell weiss und zeigt keine Enzymaktivität. Die stark trüben Flüssigkeitsmengen werden vereint und unter starker Abkühlung wird Aceton (0°) hinzugefügt, bis die Endkonzentration etwa 60% ist. Es bildet sich eine Fällung. Durch scharfes Zentrifugieren werden Niederschlag und Flüssigkeit getrennt; der Rückstand wie oben ein Mal mit 60%-iger Aceton gewaschen.

Der Niederschlag wird in Wasser (0°) gelöst und eine schwache Trübung abzentrifugiert. Die Lösung wird mit dem doppelten Volumen Methanol (0°) versetzt. Eine Fällung (A) entsteht. Dieser wird bei niedriger Temperatur

VERSUCH XIII.

Enzym und Aktivatorlösungen nach S. 110 isoliert.

Nährlösung: gleiche Mengen einer 4%-igen Hexosemonophosphat- und einer 4%-igen Hexosediphosphatlösung.

Phosphatpuffer: m/3; pH = 6,8

4: Enzym während 20 Min. im Wasserbade (70°) erwärmt.

5: Aktivatorlösung C erwärmt.

6: Aktivatorlösung B während 40 Min. im kochenden Wasserbade in einer 0,03 n NaOH-Lösung erwärmt.

	1	2	3	4	5	6
Hauptraum:						
Enzym (Trockengewicht)	60 mgr	—	60 mgr	60 mgr	60 mgr	60 mgr
Aktivatorlösung B	—	0,5 ccm	—	—	—	0,6 ccm
Aktivatorlösung C	0,5 ccm	—	—	0,5 ccm	0,5 ccm	—
Nährlösung	0,3 ccm	0,3 ccm	0,3 ccm	0,3 ccm	0,3 ccm	0,3 ccm
Pufferlösung	0,5 ccm	0,5 ccm	0,5 ccm	0,5 ccm	0,5 ccm	0,5 ccm
Wasser	0,3 ccm	0,3 ccm	0,8 ccm	0,3 ccm	0,3 ccm	0,3 ccm
Einsatz:						
KOH	0,2 ccm	0,2 ccm	0,2 ccm	0,2 ccm	0,2 ccm	0,2 ccm
O_2-Aufnahme nach 9 Min	17 cmm	—	1 cmm	—	16 cmm	3 cmm
18 Min	33	—	3	—	32	6
27 Min	48	—	5	—	46	11
36 Min	63	—	8	—	59	15
45 Min	77	0	11	0	71	19

abgesaugt, mit absolutem Methanol gewaschen und im Vakuumexsiccator bei 0° über Schwefelsäure getrocknet und aufbewahrt.

Die Flüssigkeit wird im Vakuum bei 35° stark eingeengt und von einer Trübung scharf abzentrifugiert. Eine gelbgefärbte, klare Lösung (B) entsteht. Ein Teil dieser Lösung wird mit Merkuronitrat gefällt und abzentrifugiert; der Rückstand in Wasser suspendiert und das Hg mit H_2S entfernt. Durch Durchlüftung wird die Lösung von H_2S befreit. Die Lösung (C) ist schwach gelbgefärbt.

Im Warburg-Apparat wird der O_2-Verbrauch eines Teils der Fällung (A) oder der Flüssigkeit (B oder C) gemessen nach Zusatz einer Lösung, die Hexosemono- und diphosphorsaures-Na in Phosphatpuffer enthält. Die Lösungen (B und C) zeigen keine, der Rückstand (A) eine geringe O_2-Aufnahme. Diese ist um so kleiner, je besser die Fällung mit Aceton gewaschen war. Doch darf man das nicht zu gründlich tun, da sonst der weitere Teil des Versuches nicht gelingt. Denn, fügt man Niederschlag und Flüssigkeit zusammen, so ist eine grosse O_2-Aufnahme zu verzeichnen (Spalte 1). Diese ist zwar geringer als der O_2-Verbrauch des normalen Gewebes, doch grösser als die Summe der O_2-Werte der Fraktionen A und B.

Das Extrakt B enthält eine genügende Menge Atmungsmaterial, um während einiger Zeit die Oxydation zu ermöglichen. Die Lösung C ist weitgehender von den oxydierenden Substanzen befreit, hier ist der Zusatz der Phosphorsäure-estern notwendig. Also ist die Aktivierung der Fällung A durch Lösung B nicht dadurch zu erklären, dass der Auszug B einen unbekannten Verbrennungskörper enthalten würde, der spezifisch auf das Enzym A eingestellt wäre. Für das Zustandekommen der Atmung, — oder eines Teils der Atmung —, müssen zwei Faktoren zusammenwirken.

Eine Erwärmung während 20 Min. im Wasserbade von 70° vernichtet die Aktivität der Fällung (A) völlig, während eine gleich lange Einwirkung auf die lösliche Fraktion (C) ohne jeden Einfluss ist. Eine Erhitzung im kochenden Wasserbade, in schwach alkalischer Lösung (0,03 n NaOH, 40 Min. lang), mit nachheriger Neutralisation, vernichtet die Aktivität der Lösung (B); sie ist relativ unempfindlich für eine schwach saure Lösung. Wir sind also zur Annahme berechtigt, dass die Fraktion A Enzymcharakter besitzt, deren Wirkung durch einen oder mehrere Aktivatoren ergänzt werden muss.

Bevor wir zur näheren Analyse der Natur des Enzyms und Aktivators schreiten, müssen wir uns darüber klar werden, welche Bedeutung dieser Versuch haben könnte für die Erklärung des Atmungsmechanismus im Sauromatum-Kolben. Ist die

Grösse der O_2-Aufnahme nach Vereinigung der zwei Komponenten, — Enzym und Aktivator —, nur wenige Prozente der normalen Atmung, so wäre es möglich, dass dieses System nicht identisch ist mit dem „Atmungsferment" der Sauromatum. Anders jedoch wenn dieser Wert und die Atmung dieselbe Grössenordnung zeigen; est ist dann am Wahrscheinlichsten, dass das Ferment die normale Atmung hervorruft.

Versuch XIV löst das Problem. Das Experiment stellt den am besten gelungenen Versuch dar, mit dem höchsten Wert der O_2-Aufnahme nach der Vereinigung von Enzym und Aktivator. Ich bin berechtigt eben diesen Versuch zu wählen da ich im Laufe der Untersuchung mehrere Faktoren kennen lernte, die das Ergebnis stark beeinflussen, so dass ich durch Änderung der Versuchsbedingungen immer bessere Resultate erhalten konnte. So steltte sich heraus, dass starke Abkühlung während der ganzen Isolierung unbedingt notwendig ist; auch darf das Aceton nicht zu lange, und noch weniger zu kurz auf das zerriebene Gewebe einwirken.

Das gelbe Gewebe eines Blüten-Kolbens, der sich gerade geöffnet hatte, wird untersucht. Nach seiner Zerlegung in dünnen Schnitten, wird es in 3 Portionen geteilt (wie in § 10 beschrieben) Sofort habe ich die Atmung eines Teiles gemessen, nach Zusatz einer Lösung Hexosemono- und di-phosphorsaures-Na in Phosphatpuffer (nach § 15 ist das Atmungsferment noch gesättigt). Ein zweiter Teil wird bei niedriger Temperatur zerrieben und ebenfalls wird der O_2-Verbrauch bestimmt. Dieser Wert ist während der ersten 40 Min. der Messungen 93% der normalen Atmung. Die dritte Partie der Gewebeschnitte habe ich quantitativ in einer Enzym- und Aktivator-Fraktion zerlegt. Der Aktivator ist durch Hg-Fällung roh gereinigt worden. (Bei dieser Fällung wird 20—30% seiner Aktivität vernichtet). Die Trennung ist vollständig, da weder das Enzym, noch der Aktivator eine Wirkung zeigt (Ansatz 4 und 5). Nach Vereinigung von Enzym und Aktivator (Ansatz 6) beträgt der O_2-Verbrauch 22% der Menge, die das Gewebe, aus dem beide isoliert worden sind, bei seiner maximalen Atmung aufnahm.

Bei dieser Berechnung wählte ich eine Versuchszeit von 40 Min. Während dieser Zeit nimmt die Aktivität des kombinierten Systems zuerst zu und später ab. Diese Verringerung ist nicht gross, falls man die Temperatur des Thermostaten nicht über 20° erhöht. Bei 30° findet die Inaktivierung viel schneller statt. So auch bei längerer Versuchsdauer.

VERSUCH XIV.

Die Aktivität der Atmungsfermente in den intakten Zellen und im Enzympräparat.

A.

Material: Rindenschicht in dünnen Schnitten; maximale Erwärmung.
Nährlösung: gleiche Teile einer 5%-igen Hexosemonophosphat- und einer 5%-igen Hexosediphosphatlösung.
Phosphatpuffer: 0,33 m; pH = 6,8
Co-Zymase: 120 Co/ccm
Gasraum: Sauerstoff
Temp. 18°. Die Gefässe werden 25 Min. geschüttelt vor dem Anfang der Messungen. Die O_2-Aufnahme in cmm. (Warburg-Apparat).

	1	2	3
Hauptraum:			
Gewebeschnitte	601 mgr	—	—
Fein zerriebenes Gewebe	—	690 mgr	824 mgr
Nährlösung	0,3 ccm	0,1 ccm	0,1 ccm
Pufferlösung	0,3 ccm	0,1 ccm	0,1 ccm
Co-Zymase	—	—	0,1 ccm
Wasser	1,7 ccm	0,1 ccm	—
Einsatz:			
KOH	0,5 ccm	0,5 ccm	0,5 ccm
kO_2	2,31	2,47	2,59

	Gemessen	Berechnet pro 1 gr Frischgewicht	Gemessen	Berechnet pro 1 gr Frischgewicht	Gemessen	Berechnet pro 1 gr Frischgewicht
nach 7 Min.	92	154	98	142	110	133
14 „	—	—	190	276	222	269
20 „	248	414	260	376	316	384
33 „	398	664	424	614	494	600
40 „	476	794	512	742	592	720
47 „	554	924	582	844	684	830
54 „	632	1050	640	926	738	896
	Trockensubstanz 41,4 mgr $Qo_2 = 17$					

Das Gewebe (4,58 gr) wird mit Eis fein zerrieben und durch Aceton gefällt (Endkonzentration: 0,65%). Der Niederschlag wird abzentrifugiert und 2 Mal mit 10 ccm 65%-igen Aceton gewaschen. Der Rückstand, in 15 ccm Wasser suspendiert, fällt man mit dem 2½-fachen Volumen Methanol. Die Fällung mit absolutem Methanol gewaschen und im Vakuumexsiccator über Schwefelsäure getrocknet. Das Enzym wird verrieben und für jeden Versüch 1/5 der Menge (entsprechend 0,916 gr des Frischgewichtes) verwendet. Die Isoliering ist bei niedriger Temperatur ausgeführt worden.

Die Lösung wird im Vakuum eingeengt und durch Fällung mit Hg-Nitrat gereinigt. Nach Entfernung des Hg und H_2S und Einengen im Vakuum, erhält man eine klare Aktivator-Lösung. (4 ccm). Für jeden Versuch wird 1/5 der Gesamtmenge verwendet.

	4	5	6		7	8
Hauptraum:						
Enzym; entsprechend Gewebefrischgewicht	916 mgr	—	916 mgr		916 mgr	916 mgr
Nährlösung	—	0,1 ccm	0,1 ccm		0,1 ccm	—
Pufferlösung	0,1 ccm	0,1 ccm	0,1 ccm		0,1 ccm	0,1 ccm
Aktivatorlösung	—	0,8 ccm	0,8 ccm		—	0,8 ccm
Co-Zymase	—	—	—		0,8 ccm	—
Wasser	0,9 ccm	—	—		—	0,1 ccm
Einsatz:						
KOH	0,3 ccm	0,3 ccm	0,3 ccm		0,3 ccm	0,3 ccm
k_{O_2}			1,55		1,64	
			Gemessen	Berechnet pro 1 gr Frischgewicht		
nach 7 Min.	—	—	30	32	16	3
14 „	—	—	67	74	32	5
21 „	—	—	108	118	49	6
42 „	5	0	170	185	60	9

B.
Material: Appendix, maximale Erwärmung.
Enzym und Aktivator: wie oben isoliert.

Hauptraum:			
Fein zerriebenes Gewebe	47 mgr	—	47 mgr
Enzym (Trockengewicht)	—	64 mgr	64 mgr
Nährlösung	0,1 ccm	0,1 ccm	0,1 ccm
Pufferlösung	0,1 ccm	0,1 ccm	0,1 ccm
Aktivatorlösung	—	0,7 ccm	0,7 ccm
Wasser	0,7 ccm	0,1 ccm	—
Einsatz:			
KOH	0,2 ccm	0,2 ccm	0,2 ccm
O_2-Aufnahme nach 9 Min.	24 cmm	17 cmm	40 cmm
18 „	46	36	78
27 „	67	49	114
36 „	90	63	146

Fassen wir die Ergebnisse der beschriebenen Versuchsreihen zusammen, so können wir feststellen:

A. Die O_2-Aufnahme fein zerriebener Appendix-Zellen (Gewebebrei) wird vom selben Enzymkomplex verursacht, wie die Atmung der normalen Zellen.

Ich gründe diese Auffassung auf folgende Erwägungen:
a. die Atmungsintensitäten vom normalen Gewebe und vom Gewebebrei sind praktisch gleich gross [1]). (Versuch XII und XIV).
b. ist das Atmungsferment der intakten Zellen gesättigt, so kann man ebenfalls die Sauerstoffaufnahme des Gewebebreis durch Glucose-oder Hexosephosphorsäure-Zusatz nicht erhöhen.
c. ist im normalen Gewebe das Atmungsferment ungesättigt (z.B. nach dem Optimun der Blütenperiode; beim Züchten der Pflanzen bei niedriger Temperatur des Gewächshauses), dann erzeugt der Zusatz von Verbrennungsmaterial zum Gewebebrei eine Erhöhung des Sauerstoffverbrauches. Die Endwerte der Atmung nach der Sättigung sind wieder praktisch gleich gross (den Brei nicht verdünnen!).
Diese drei Versuche wären schwer zu deuten, wenn der normale Atmungsmechanismus beim Verreiben vernichtet und durch einen neuen Mechanismus ersetzt sein würde.

B. Das isolierte System: Enzym und Aktivator, ist ein wichtiger Teil des normalen Atmungsfermentes.
a. Allgemein macht man die Annahme, dass bei der KH-Veratmung, der Prozess in einen anaeroben und einen oxydativen Teil zerfällt. Die einleitende Phase, die ohne freien Sauerstoff eintritt, verläuft über Hexosemono- und diphosphorsäure als Zwischenprodukte. Nun oxydiert das isolierte System, gleich wie die normalen Zellen, die genannten Phosphorsäure-Verbindungen (Versuch XIII und XIV). Es besteht also die Möglichkeit, dass es auch im lebenden Gewebe wirksam wäre.

b. Zweitens könnte man daran denken, dass das System zwar in den Zellen vorhanden, doch durch die Anwesenheit von Hemmungskörpern unwirksam ist. Da nach Versuch XIV die

1) Dass dieser Fall nicht für alle Gewebe zutrifft, zeigt folgendes Beispiel. SZENT-GYÖRGYI berichtet, dass zerkleinerte Kartoffeln eine 15-mal stärkere Sauerstoffaufnahme vermitteln als intaktes Zellmaterial. Er nimmt an, dass im unbeschädigten Material das Enzym (eine Polyphenolase) und sein Substrat getrennt von einander vorliegen. Das System würde keine Bedeutung für den normalen Atmungsprozess haben; jedoch wäre die postmortelle Atmung hauptsächlich seiner Wirkung zuzuschreiben.

Aktivität des isolierten Fermentes. nicht vom Gewebebrei gehemmt wird, sind wir zur Annahme gezwungen, dass das System auch in den normalen Zellen in aktiver Form vorliegt.

c. Weiter wäre noch möglich, dass die Verbrennungssubstanzen eine grössere Affinität zu anderen oxydierenden Fermenten als zum untersuchten System haben, so dass die zuletzterwähnten Enzyme fast keine Oxydation herbeiführen können. Dann müsste jedoch nach Zusatz eines Überschusses von den Phosphorsäureestern zum Gewebebrei auch diese Enzyme im Stande sein, Sauerstoff zu übertragen und müsste, nach dem Ergebnis von Versuch XIV die Sauerstoffaufnahme mindestens um 22% erhöht werden. Das ist nicht der Fall. (Versuch XII).

Aus allem geht hervor, dass das erwähnte und in seiner Wirkung noch nicht näher erforschte System an dem normalen Atmungsprozess der Sauromatum-Kolben beteiligt ist, und mindestens $^1/_5$ Teil des veratmenden Sauerstoffs überträgt.

Ich meine, dass wir am besten die Auffassung vertreten können, dass das Enzymsystem nur einen Teil des Atmungsfermentes enthält. Wahrscheinlich findet keine vollständige Verbrennung des Atmungsmaterials statt. Da die Methodik der Fermentisolierung gewisse Ähnlichkeiten mit den Weeverschen Versuchen aufweist, könnte man fragen, ob hier vielleicht auch Säuren gebildet werden.

Diese Fragen habe ich wegen Materialmangel noch nicht beantworten können.

§ 17. Der Appendix enthält weder Cytochrom, noch eine Phenolase.

Ich möchte hier kurz von einigen anderen Versuchen berichten.

In der ersten Mitteilung (v. Herk und Badenhuizen) wurde nachgewiesen, dass die Atmung gehemmt wird von Blausäure, Kohlenoxyd und Urethan. Man hätte diese Versuche so deuten können, dass das Atmungsferment der Sauromatum zur Gruppe der sauerstoffaktivierenden, schwermetallhaltigen Fermente gehört. Die Hemmungserscheinungen stimmten mit den Resultaten der Warburgschen Experimente überein; nur zeigten wir, dass sie bei Sauromatum nicht so intensiv sind, wie wir nach dieser Theorie erwarten dürften. Doch der Nachweis, dass das Enzym Katalase mit der Atmungsgrösse in Zusammenhang steht, wies schon damals darauf hin, dass diese Schlussfolgerung viele Bedenken verursachen würde. Da das Problem im Rahmen dieser Untersuchung wichtig war, habe ich einige weiteren Versuche angestellt.

Soweit die Sauerstoffatmung mit Hilfe von Eisen-Porphyrin-Verbindungen (Hämine) geschieht, reagiert der Sauerstoff, nach WARBURG und CHRISTIAN (den Ansichten KEILINS erweiternd), zunächst mit dem sauerstoffübertragenden Häminferment (das Warburgsche „Atmungs-ferment"). Dieses wirkt nicht direkt auf den Substratwasserstoff ein, sondern es sind wenigstens 3 verschiedene Cytochrome als „Zwischenkatalysatoren" eingeschaltet. Wahrscheinlich müssen noch weitere Zwischenträger mitwirken.

Wäre die Atmung des Sauromatum-Kolbens auf die Wirkung dieses Ferments zurückzuführen, so müsste man Cytochrom im Gewebe nachweisen können. Mit den mir zur Verfügung stehenden Mitteln, konnte ich jedoch diese Substanz nicht nachweisen (auch nicht nach Zusatz von Reduktionsmitteln).

Manche Zellen enthalten das Protohaematin, unabhängig davon, ob Cytochrom anwesend ist oder nicht. Beide Substanzen sind chemisch nahe verwant. Das Protohaematin-Absorptionsspektrum ist so diffus, dass es nicht sichtbar ist durch direkte, spektroskopische Beobachtung. Wenn man das Hämatin durch $Na_2S_2O_4$ und Pyridin in Pyridin-Hämochromogen verwandelt, wird das Absorptionsspektrum sehr deutlich. Man kann die Menge des Pigmentes schätzen durch Vergleich mit Standardlösungen. Macht man diesen Versuch mit dem Sauromatum-Gewebe, so treten die Absorptionsbände nur ganz schwach hervor. Die genannte Substanz fehlt zwar nicht völlig, doch ist nur in sehr geringer Menge anwesend.

Diese Versuche beweisen, dass die Atmung wahrscheinlich nicht mit Hilfe vom sauerstoffübertragenden Häminferment geschieht.

Man könnte auch an die Anwesenheit einer Phenolase als Atmungsferment denken.

Phenolasen kommen in der Natur weit verbreitet vor. Die Indophenol-oxydase katalysiert die Oxydation von Paraphenylendiamin oder „Nadi"-Reagens; die Polyphenoloxydase die von Polyphenolen. Es lässt sich zur Zeit nicht entscheiden, ob wir verschiedene Phenolasen anzunehmen haben, oder ob ein einziges Ferment vorliegt. Das erschwert die Beantwortung der Frage nach ihrer biologischen Bedeutung bei den normalen Zellvorgängen. Diese Frage ist noch durchaus offen, doch sind 3 Hypothesen aufgestellt worden. Dabei lasse ich die Auffassung von SZENT-GYÖRGYI, nach der die Phenolasen keine Bedeutung für die Zellatmung haben, ausser Betracht (vgl. dazu SUTTER, 112).

PALLADIN hat die Ansicht vertreten, dass die bei der Phenolase-Wirkung gebildeten Chinone wieder als Oxydationsmittel auf zelleigene Stoffe einwirken, und so als Zwischenglieder der Atmung wirken.

Beruht die O_2-Übertragung bei der Atmung auf eine Häminkatalyse, so

ist nach KEILIN die Indophenolase ein unentbehrlicher Faktor der normalen Verbrennung, da sie das reduzierte Cytochrom oxydiert und dieses den Sauerstoff auf den Substratwasserstoff überträgt. Die Indophenolase selbst braucht kein Schwermetall zu enthalten. So würde, nach diesem Forscher, ein merklicher Parallelismus bestehen zwischen dem Vorkommen von Cytochrom, sowie Indophenolase, und der Atmungsintensität.

Nach SHIBATA und TAMIYA bildet das Cytochrom eine lockere, dissozierbare Bindung mit molekularem Sauerstoff; die Indophenolase oxydiert das Paraphenylendiamin auf Kosten des durch Cytochrom gebundenen Sauerstoffs. Auch andere Versuche weisen darauf hin, dass irgend ein physiologisch wichtiger Zusammenhang bestehen muss zwischen dem Cytochrom c und der Indophenolase. Denn, mit wenigen Ausnahmen, entbehren alle Bakterien-Arten, die frei von Cytochrom c sind, die Indophenolase, und bei allen Indophenolaseführenden Bakterien ist die c-Komponente des Cytochroms vorhanden. Die Natur dieser Beziehung ist noch unklar.

Ich möchte nicht eingehen auf das Für und Wider dieser drei Theorien. Sie haben den Grundgedanke gemein, dass die Phenolasen, ohne Chinon (PALLADIN) oder Cytochrom (KEILIN, u.a.) nicht auf den Substratwasserstoff einwirken, so dass man diese Substanzen, im gewissenen Sinne, als „Aktivatoren" betrachten könnte.

Es fragt sich jetzt, ob das Sauromatum-Gewebe eine Phenolase enthält.

Die Indophenol-Reaktion wurde in Thunberg-Röhrchen ausgeführt, die jeweils mit einem Reaktionsgemisch von folgender Zusammensetzung versehen wurden:

1 ccm Gewebesuspension; Enzymsuspension (A); Aktivatorlösung (B) oder Enzymsuspension + Aktivatorlösung.
1 ccm $^1/_{10}$ mol Phosphatpuffer pH = 7,3
2 ccm Dest. Wasser.
1 ccm „Nadi"-Reagens (gleiche Teile folgender 3 Lösungen, die frisch zubereitet wurden: 0,01 mol Dimethyl-p-phenylendiamin-Hydrochlorid; 0,01 mol γ.-Naphtol (beide in 50% Alkohol gelöst) und 0,25%-ige Lösung von Na-Carbonat in dest. Wasser).

Es wird kräftig an der Luft (Sauerstoff) geschüttelt und bei positiver Reaktion wird die blaue Farbe des Indophenols nach verschiedenen Zeitabschnitten beobachtet.

Die Polyphenol-Reaktion wurde bestimmt durch Messung der O_2-Aufnahme im Warburg-Apparat, nach Zusatz folgendes Reaktionsgemisches:
1 ccm Gewebesuspension, u.s.w.
1 ccm $^1/_{10}$ mol Phosphatpuffer pH = 6,8
1 ccm Hydrochinon-Lösung (0,1 mol).
Im Einsatz KOH.

In beiden Fällen wird immer ein Kontrollversuch ohne Gewebesuspension u.s.w. ausgeführt.

Diese Versuche ergaben ein negatives Resultat. Ich erhielt weder mit der ersten Versuchsanordnung eine Blaufärbung, noch

mit der zweiten Versuchsserie eine O_2-Aufnahme. KEILIN hat nun gezeigt, dass die Oxydase-reaktion bei der Hefe durch das reduzierende System der Zellen mehr oder weniger stark verhindert wird. Dementsprechend tritt eine deutliche positive Reaktion nur bei unterdrücktem Reduktionssystem auf. Die Verhinderung der Dehydrasewirkung erhielt er durch Erwärmung der Zellen, während ± 1½ bis 2 Stunden auf 52°, Narkotisierung mit Urethan oder Entfernung der zelleigenen Donatorsubstanzen durch Auswaschen oder längere Durchlüftung. Ich untersuchte jeden dieser Einflüsse, doch es trat keine Phenolasereaktion auf.

Wir können also schliessen, dass das Sauromatum-Gewebe weder eine Indophenolase noch eine Polyphenolase enthält.

§ 18. **Eine Vorfrage.**

In § 16 wurde nachgewiesen, dass die Atmungsenzyme durch einen Aktivator ergänzt werden müssen. Wir versuchen jetzt über die Natur dieses Aktivators näheren Aufschluss zu erhalten.

Wie aus manchen Untersuchungen (§ 3) hervorgeht, beruht die Aktivierung vieler Enzyme auf die Wirkung von Co-Zymase oder Warburgs Co-Ferment (Co-Dehydrase II). Spielen die Co-Fermente auch in der vorliegenden Reaktion eine Rolle?

Ich versuchte das Problem zu lösen durch die Beantwortung der folgenden Fragen:

1. Befindet sich im Aceton-Extrakt der Blütenkolben eines der genannten Co-Fermente?

2. Kann man die Enzymsuspension durch Zusatz einer Lösung des reinen Co-Ferments völlig aktivieren?

Nur wenn beides zutrifft, dürfen wir schliessen, dass das untersuchte Co-Enzym mit der wirksamen Substanz des Extraktes identisch ist. In § 19 bespreche ich die Versuche mit Co-Zymase; in § 20 die mit dem Warburgschen Co-Ferment.

§ 19. **Die Co-Zymase.**

Der Nachweis der Co-Zymase geschieht durch ihre Einwirkung auf Apozymase und auf die Alkoholdehydrase aus Hefe. Da diese Co-Zymase-Prüfungen eindeutig sind (§ 3), werden sie allgemein als eine Reaktion auf dieses Co-Enzym verwendet.

Der Appendix wird in dünnen Scheiben geschnitten. Ein bestimmter Teil wird mit Quarzsand fein zerrieben und mit dest. Wasser ½ Stunde auf dem Wasserbad (60°) extrahiert; nachher wird die Flüssigkeit scharf abzentrifugiert. Das wird 2 mal wiederholt, wodurch eine hinreichend vollständige Extraktion erreicht wird. Die vereinigten, wässrigen Lösungen sind im Vakuum eingeengt, klar zentrifugiert und auf ein bestimmtes Volumen angefüllt. Diese Lösung ist auf Co-Zymase geprüft worden.

Aus Versuch XV schliessen wir, dass im Sauromatum-Extrakt eine Substanz anwesend ist, die dieselbe Wirkung hat wie Co-Zymase.

Die Lösung wurde nach einer von Myrbäck gegebenen Reinigungsvorschrift weiter verarbeitet. Die Arbeitsmethode habe ich in § 7 für die Isolierung der Hefen-Co-Zymase kurz beschrieben. Der einzig wesentliche Unterschied war, dass es mir nicht gelang eine genügend grosse Ausbeute nach der Bleiacetat-Fällung im Filtrat zu erhalten. Diese partielle Reinigung, die beim Hefe-Extrakt möglich ist, musste hier unterbleiben. Auch Myrbäck berichtet, dass die Behandlung mit Bleiacetat nicht immer gelingt. Nach der Reinigung mittels Hg-, Phosphorwolframsäure- und Ag-Fällungen erhielt ich eine vollkommen klare und farblose Lösung, die 3,2 mg Trockensubstanz pro Kubikzentimeter enthielt. Gärungsversuche mit 0,1 und 0,2 ccm der Lösung zeigten, dass sie 16,4 Co-Einheiten pro ccm enthält. Der Reinheitsgrad dieser Lösung ist also ACo = 5100. Im Vergleich zu den reinsten aus Hefe gewonnenen Co-Zymase-Lösungen (ACo = 100.000—300.000) ist der Reinheitsgrad nicht besonders gross. Die Steigerung des Reinheitsgrades durch die vorgenommenen Fällungen

VERSUCH XV.

Material: Frischgewicht ungefähr 550 gr; Trockengewicht ± 70 gr
Extrakt: 1000 ccm Trockensubstanz: 21,7 mgr/ccm.

Gärungsversuch mit Apozymase (siehe § 7).

	ccm CO_2 nach Minuten: (die Messungen fangen 3/4 Stunden nach Versuchsbegin an)							Co-Zymase Menge
	20	40	60	80	100	120	160	
1,4 ccm Wasser	0	0	0	0,1	0,2	0,3	0,5	$\frac{0,5}{2} = 0,25$
1 ccm Extrakt und 0,4 ccm Wasser	0,4	1,3	2,4	3,5	4,7	5,8	7,9	$\frac{7,9-1,3}{2} = 3,3$
1,4 ccm Extrakt	1,1	2,6	4,1	5,7	7,2	8,8	11,7	$\frac{11,7-2,6}{2} = 4,55$

1 ccm enthält also 3,3 — 0,25 = 3,1 Co und $\frac{4,55-0,25}{2}$ = 3,1 Co. Im Mittel: 3,1 Co. Gesamtmenge 1000 × 3,1 = 3100 Co; Reinheitsgrad ACo = $\frac{3,1}{0,0217}$ = 140.

Die Lösung wird mit Merkuronitrat gefällt; nach Zerlegung des Niederschlags mit H_2S und Verjagen des H_2S aus dem Filtrat wird die schwefelsäure-haltige-Lösung mit Phosphorwolframsäure vollständig gefällt und der Niederschlag nach VAN SLYKE zersetzt. Nach Beseitigung der Schwefelsäure mit Baryt erhielt ich mit Silbernitrat aus der Salpetersäure-haltige Lösung nur eine geringe Fällung und mit Silbernitrat und Ammoniak 2 Fraktionen, die nachdem die Suspension von Silber befreit waren, zwei Co-Zymase-Lösungen ergaben:

A. 30 ccm; 16,4 Co/ccm. Gesamtmenge: 490 Co; Trockengewicht 3,2 mgr/ccm; ACo = 5100.

B. 15 ccm; 4 Co/ccm Gesamtmenge: 60 Co.

Die Wirkung auf Alkoholdehydrase (Thunberg-methodik):

Enzymlösungen: Alkoholdehydrase; Hefemazerationssaft mit Alkohol gefällt (nach v. EULER, ADLER, SCHLENK und GÜNTHER). 0,2 gr der Fällung in 10 ccm m/15 Phosphatpuffer pH = 7,6; klar abzentrifugiert.

Flavinenzym (nach WARBURG); 1 ccm enthält 0,8 γ Flavin.

Phosphatpuffer m/15 pH = 7,6

Alkohol 10%

Methylenblau 1 : 5000.

Co-Zymaselösung: 20 Co/ccm, ACo: 61000 (auf Apozymase geprüft).

Alkohol ccm	Dehydrase ccm	Flavinenzym ccm	Lösung A ccm	Co-Zymase Lösung ccm	Wasser ccm	Puffer ccm	MBl ccm	Entfärbungszeit in Min.
0,25	0,25	0,25	0	0	1	0,75	0,5	> 180
0,25	0,25	0,25	1	0	0	0,75	0,5	14
0,25	0,25	0,25	0	1	0	0,75	0,5	9

ist jedoch gross; dieser Wert erhöhte sich von 140 auf 5100.

Die Gesamtmenge der Co-Zymase, in dieser Lösung vorhanden, beträgt 490 Co. Dass diese Menge viel geringer ist als in der Ausgangslösung ist nicht befremdend, da die Isolierungsmethode keine quantitative Ausbeute gibt. Dass die Verluste so gross sind und ich nur 15 Prozent der Co-Zymase-Menge in der gereinigten Lösung erhielt, hat einen besonderen Grund. Wegen Materialmangel konnte ich die Reinigung nur einmal ausführen nach wenigen Vorversuchen. Und diese Ausgangslösung musste ich noch zu verschiedenen Zeitpunkten aus verschiedenem Material sammeln. Niemand darf erwarten, dass man unter diesen ungün-

stigen Bedingungen den höchsten Ertrag erhält. Ausserdem gelingt die Isolierung am besten mit einer Lösung, die 10.000—20.000 Co enthält. Da die maximale Co-Zymase Menge im Appendix etwa 80 Co beträgt (Versuch XXV), braucht man für jeden Isolierungsversuch etwa 125-250 blühenden Kolben. Über so grosse Materialmengen konnte ich bis jetzt nicht verfügen!

Das Ergebnis ist, dass nach Entfernung einer grossen Menge Begleitstoffe, das Extrakt noch eine positive Co-Zymase-Reaktion zeigt (vgl. seine Wirkung auf die Alkoholdehydrase).

Im weiteren Verlauf dieser Untersuchungen muss ein neuer Isolierungsversuch mit grösseren Materialmengen ausgeführt werden zur Beantwortung der Frage, ob die Sauromatum-Co-Zymase mit der Hefen-Co-Zymase identisch ist. Dies ist ja äusserst wahrscheinlich; wir dürfen jedoch diesen Schluss nur ziehen, wenn die Aktivatorlösung alle Eigenschaften einer Co-Zymase-Lösung zeigt, die Myrbäck beschrieben hat.

Die Co-Zymase-Menge pro gr. Trockensubstanz ist 44 Co (der Versuch gibt nur einen Mittelwert aus vielen Kolben!). Berechnet man diesen Wert für einen Appendix (mittleres Trockengewicht 1,5 gr.) so ergibt sich 68 Co (vgl. Versuch XXV), oder, wenn angenommen werden kann, dass die reine Co-Zymase einen ACo-Wert von etwa 300.000 hat, etwa ¼ mg Co-Zymase. In der Hefe hat man mehr als 100 Co pro gr. Trockensubstanz gefunden; in Erbsen 10-30, Lupinensamen $\pm$ 2 u.s.w. Hieraus erhellt, dass im Appendix eine relativ grosse Co-Zymase-Menge vorhanden ist.

Im folgenden Versuch (XVI) zeige ich, dass eine reine Co-Zymase-Lösung zum Teil die Wirkung des Aceton-extraktes ersetzten kann. Wir vergleichen dazu mit der Versuchsanordnung XIII die aktivierende Wirkung des Extraktes mit der Wirkung einer Co-Zymase-Lösung. Beide Lösungen haben ungefähr dieselbe Aktivität auf Apozymase. Im zuersterwähnten Fall wird 131 cmm O_2 pro ½ Stunde aufgenommen; im zweiten Fall 47 cmm. Diese Differenz ist nicht darauf zurückzuführen, dass die Co-Zymase die Geschwindigkeit der Oxydation bedingen würde, denn wie aus Spalte 3 hervorgeht, erzeugt eine 3 mal grössere Menge Co-Enzyms denselben Aktivierungsgrad.

Ich wählte für diesen Versuch eine Co-Zymase-Lösung, die nach § 7 weitgehend von Co-Dehydrase II gereinigt ist. Die geringe Menge dieses Co-Ferments, die immer noch in der Lösung vorhanden ist, kann den O_2-Mehrverbrauch nicht verursachen. Denn wäre die aktivierende Wirkung auf diese Verunreinigung zurückzuführen, so wäre, wenn wir das Resultat vom Versuch XX berücksichtigen, mit der 3-fachen Menge Co-Zymase (also

VERSUCH XVI.

Vergleich zwischen dem Aktivator und Co-Zymase am System des Atmungsfermentes.

Enzym: „Acetonfällung aus Sauromatum-Extrakt". 0,2 g in 10 ccm m/20 Phosphatpuffer pH = 6,8
Aktivatorlösung enthält 24,6 Co/ccm, auf Apozymase geprüft.
Co-Zymase (vgl § 7); 1 ccm = 90 Co; ACo = 88000
WARBURG Methodik.

	1	2	3	4
Enzym	1 ccm	1 ccm	1 ccm	1 ccm
Aktivatorlösung	0,5 ccm	—	—	0,5 ccm
Co-Zymase	—	0,16 ccm	0,5 ccm	0,5 ccm
Phosphatpuffer	0,5 ccm	0,5 ccm	0,5 ccm	0,5 ccm
Hexosemono-und diphosphorsaures-Na 2½ %	0,5 ccm	0,5 ccm	0,5 ccm	0,5 ccm
Einsatz KOH	0,4 ccm	0,4 ccm	0,4 ccm	0,4 ccm
O_2-Aufnahme in cmm nach				
10 Min.	47 cmm	16 cmm	19 cmm	43 cmm
20 „	93	33	36	87
30 „	131	47	50	125
40 „	165	61	63	159
50 „	194	72	75	184

auch mit einer 3 Mal grösseren Menge Co-Dehydrase II) eine starke Erhöhung der O_2-Aufnahme zu erwarten. Das ist nicht der Fall.

Co-Zymase ist einer der Aktivatoren der Atmungsfermente des Sauromatums.

Es fragt sich, ob durch Co-Zymase-Zusatz der O_2-Verbrauch erhöht wird. Nach den Versuchen XIV und XVI ist das weder der Fall nach ihrem Zusatz zum zerriebenen Gewebe, noch nach ihrem Zusatz zur Enzym- und Aktivatorlösung. Der Einfluss der Co-Zymase auf den Gewebebrei habe ich nur untersucht mit einem Blütenkolben, der sich gerade geöffnet hatte. Ob man dasselbe Ergebnis mit anderen Stadien der Blütenperiode erhalten würde, ist nicht bekannt. Während des Zeitabschnittes der maximalen Atmung wirkt die Co-Zymase nicht begrenzend.

Ich füge hier einige Versuche hinzu, die von Bedeutung sind für die quantitative Bestimmung der Co-Zymase im Appendix (siehe Abschnitt VII).

v. EULER und STEFFENBURG haben nachgewiesen, dass Presssäfte von höheren Pilzen und grünen Pflanzenteilen (zerkleinerten Blättern von Vicia Faba) eine hemmende Wirkung auf die Co-

VERSUCH XVII.

Co-Zymase Bestimmungen mit Apozymase (vgl. § 7):

	ccm CO_2 in einer Stunde bei konstanter Gärgeschwindigkeit
1. Apozymase	0,3
2. Apozymase + Co-Zymase (0,1 ccm; 2,2 Co)	2,5
3. Apozymase + 0,3 ccm Aktivatorlösung B (vgl. S. 111)	4,2
4. Apozymase + 0,3 ccm Aktivatorlösung + 0,1 ccm Co-Zymase	6,3

VERSUCH XVIII.

Material: Gewebeschnitte (Rindenschicht).
A I: 1,45 gr Frischgewicht
A II: 1,73 gr „
B I: 1,39 gr „
B II: 164 gr „

Die Schnitte werden verrieben und die Co-Zymase extrahiert (nach S. 120). Die Lösung wird eingeengt und klar zentrifugiert. Zu den Portionen B I und II ist vor dem Verreiben ½ ccm einer Co-Zymase-Lösung (11,1 Co) hinzugefügt worden.

Co-Zymase Bestimmung (auf Apozymase geprüft):

	Gewicht der Lösung	Co-Zymase Bestimmung		Co-Zymase Bestimmung		Gesamtmenge Co-Zymase	Co/gr Frischgewicht
		in	CO	in	CO		
A I	7,45 gr	0,713 gr	1,1	1,426 gr	2,2	11,5	7,93 } Mittelwer : 8,0
A II	6,72 gr	0,703 gr	1,5	1,406 gr	2,9	14,0	8,09
B I	13,43 gr	0,674 gr	1,0	1,348 gr	2,2	21,3	
B II	11,59 gr	0,690 gr	1,4	1,380 gr	2,8	23,5	

Nach Versuch A ist in B I vorhanden 1,39 × 8,0 = 11,1 Co
B II „ 1,64 × 8,0 = 13,1 Co

Von der hinzugefügten Co-Zymase-Menge (11,1 Co) wird wiedergefunden:
In B I: 21,3 — 11,1 = 10,2 Co
In B II: 23,5 — 13,1 = 10,4 Co

Zymase-Aktivität zeigen. Es handelt sich hier um eine Gruppe von Hemmungskörpern mit einer grossen Thermostabilität. Neuerdings haben v. EULER, ADLER und DAHLGREN in Autolysaten der Oberhefe einen Stoff gefunden, der ebenfalls hemmend wirkt.

Diese Substanz war thermolabil. Es ist also nicht erlaubt, die Co-Zymase-Menge einfach mittels eines Gärungsversuches zu bestimmen.

Die Sauromatum-Extrakte wirken nicht wesentlich hemmend auf das System Apozymase und Hefe-Co-Zymase. Die Gärung ist die Summe der Gärungswerte des Extraktes und der reinen Co-Zymase Lösung (Versuch XVII; vgl. Ansatz 2, 3 und 4). Nichts weist auf das Vorkommen eines Hemmungskörpers hin.

Eine zweite Möglichkeit wäre, dass beim Zerkleinern des Gewebes ein Teil der Co-Zymase vernichtet wird. Bekanntlich kann die Co-Zymase durch Fermentwirkungen (Phosphatasen) gespaltet werden, bei der anorganisches Phosphor in Freiheit gesetzt wird. Das hebt seine Aktivität schon völlig auf.

Betrachtet man die Co-Zymase-Menge im Pflanzenextrakt als Mass der Menge, die im Gewebe vorhanden ist, so darf bei der Isolierung nichts vernichtet werden. Auch muss die am Plasma absorbierte Menge sehr gering sein.

In Versuch XVIII teilte ich die Gewebeschnitte in vier Portionen (A I, II und B I, II) und fügte zu B eine bestimmte Menge Co-Zymase hinzu. Die zugefügte und die im Gewebe vorhandene Menge sind ungefähr gleich gross. Beide Teile werden mit Quarzsand verrieben und in gleicher Weise extrahiert. Ich erhielt in B keine Wirkung, die genau die Summe der Aktivitäten von A und der Co-Zymase war. Ein geringer Verlust des Co-Enzyms während die Extraktion hat statt gefunden. Sie beträgt 7%; der höchste Wert, den ich beobachtete, war 11%. Der Fehler ist am geringsten, wenn die zugefügte Menge Co-Enzyms relativ gross ist gegenüber die im Gewebe vorhandene Menge. Nach der Extraktion ist im Rückstand keine Co-Zymase mehr nachweisbar. Wir dürfen annehmen, dass man praktisch alles Coferment der Zellen bestimmt.

Es sei hier bemerkt, dass die Versuche XVII und XVIII mit gleichem Resultat, mit Material von verschiedenem Entwicklungszustand wiederholt wurden. Nur in ausgeblühten Kolben, als der Appendix abzusterben anfängt, ist eine Hemmung der Co-Zymasewirkung nachweisbar.

§ 20. Das Warburgsche Co-Ferment.

Der Zusatz von Co-Zymase allein genügt nicht um die Enzymsuspension völlig zu aktivieren. Ist der zweite Aktivator identisch mit dem Warburgschen Coferment? Der Nachweis dieser Substanz ergibt sich aus einer Wirkung auf das in § 7 beschriebenen System.

Die Extraktion des Warburgschen Coferments geschieht in derselben Weise wie die der Co-Zymase. Danach muss es vom Flavinenzym und Zwischenferment (wenn anwesend) getrennt werden. Auch befinden sich in der Lösung Substanzen, die die Aktivität des Co-Enzyms herabsetzen. Zur ersten Reinigung wird Aceton (Temp. 0°) hinzugefügt (1 Teil Flüssigkeit und 1,5 Teile Aceton). Man lässt das Gemisch einige Stunden im Eisschrank stehen und zentrifugiert die Fällung scharf ab. Das Aceton wird im Vakuum aus der Flüssigkeit entfernt. Die wässrige Lösung enthält keine der genannten Enzyme (vgl. Versuch XIX Spalte 5), und hemmt die Oxydation der Hexosemonophosphorsäure weit weniger als die rohe Lösung. In ersterer wird der Gehalt am Warburgschen Coferment nach § 7 bestimmt.

In Versuch XIX ist das gelbe Gewebe eines Kolbens untersucht worden. Es zeigt sich, dass sich im Extrakt eine Substanz befindet, die im Modellversuch eine Aktivierung gibt. Da dieser Test nach Warburg eindeutig ist und Co-Zymase diese Reaktion nicht zeigt, ist es wahrscheinlich, dass die Lösung Co-Dehydrase II enthält. Auch gelingt es eine weitere rohe Reinigung vorzunehmen (nach Warburg) durch Hg-Fällung, in der zwar 40% der Cofermentmenge verloren geht. Nach dieser Behandlung ist der Hemmungskörper völlig entfernt worden. Wegen Materialmangel konnte ich keinen Versuch zur Isolierung des Aktivators vornehmen. Ein exakter Vergleich dieser Substanz mit den sehr reinen Warburgschen Coferment-Lösungen war also nicht möglich.

In der Lösung befindet sich pro cmm 0,6 Co II Einheiten, auf den ganzen Appendix berechnet 2,7 Co II und pro gr Trockensubstanz dieses Organs 2,6 Co II. Über Cofermentmengen in anderen Zellen liegen noch keine Angaben vor, da es nur isoliert worden ist aus Pferdeblutzellen (Warburg) und Hefe (v. Euler und Adler). Ich habe einige Messungen an anderem Pflanzenmaterial auszuführen versucht (Erbsen und Lupinensamen; Blättern von Spinat), doch es ergab sich nur, dass die darin vorhandenen Mengen so gering sind, dass sie kaum nachweisbar sind. Im Vergleich zu diesen Objekten liegt im Sauromatum-Appendix eine relativ grosse Menge vor. Das ist nicht der Fall, wenn man diese Menge mit der in Hefe oder Pferdeblutzellen vergleicht.

Spielt das Warburgsche Coferment eine Rolle bei der Aktivierung des Sauromatum-Atmungsferments?

Da ich schon nachgewiesen habe, dass Co-Zymase ein wichtiger Aktivator ist, konnte ich zwei Versuche ausführen: entweder die Wirkung des Coferments II allein auf die Enzymsuspension untersuchen, oder die kombinierte Wirkung von Coferment und Co-Zymase. Die zweite Frage interessierte mich zuerst am meisten. Denn ist diese Wirkung gleich die des oben erwähnten Acetonextraktes (Seite 110), so beweist diese Tat-

VERSUCH XIX.

Co-Dehydrase II im Pflanzenextrakt.

Material: Appendix eines Blütenkolbens während dem Aufblühen.
10,7 gr. der gelben Rindenschicht werden mit Wasser extrahiert, u.s.w.
Extrakt nach Einengung: 4 ccm

Hexosemonophosphorsaures-Na	0,2 ccm	0,2 ccm	0,2 ccm	0,2 ccm
Extrakt	—	0,5 ccm	1,0 ccm	0,5 ccm
Wasser	1,0 ccm	0,5 ccm	—	1,2 ccm
m/10 Phosphatpuffer pH = 5,4	0,2 ccm	0,2 ccm	0,2 ccm	0,2 ccm
Flavinenzym (2 γ Flavin/ccm)	0,7 ccm	0,7 ccm	0,7 ccm	—
Zwischenferment	0,8 ccm	0,8 ccm	0,8 ccm	0,8 ccm
KCN	0,2 ccm	0,2 ccm	0,2 ccm	0,2 ccm
Einsatz: 5%-ige KOH	0,2 ccm	0,2 ccm	0,2 ccm	0,2 ccm
O_2-Aufnahme nach				
10 Min.	1 cmm	19 cmm	36 cmm	—
20 „	1	34	67	—
30 „	2	52	94	—
40 „	3	63	116	0 cmm

sache, dass keine anderen Aktivatoren als die Co-Zymase und Co-Dehydrase II im Atmungssystem notwendig sind. Ist dagegen ihre Wirkung kleiner als die des Extraktes, so müssen wir in der Lösung wiederum einen neuen Aktivator suchen. Und ändert zuletzt der Zusatz des Warburgschen Coferments die Aktivität des Systems mit Co-Zymase nicht, so hat es überhaupt keine Bedeutung oder vielleicht genau dieselbe Bedeutung wie die Co-Zymase.

Ich beschickte die Atmungsgefässe mit einer Enzymsuspension (siehe S. 110), und mit Lösungen von Co-Zymase, Hexosemono- und diphosphorsaurem-Natrium und Katalase. Zum Inhalt eines Gefässes fügte ich eine Lösung des Warburgschen Coferments hinzu; zu der eines zweiten eine konzentrierte wässrige-Lösung des „Aceton-Extrakts". Nach Versuch XX erhöht das Warburgsche Coferment den O_2-Verbrauch stark und zwar soviel, dass die O_2-Aufnahme mit dem Gemisch der beiden Cofermente gleich der mit dem natürlichen Aktivator ist. Spalte 6 zeigt, dass eine grössere Menge des Warburgschen Coferments keine stärkere Oxydation hervorruft. Aus Ansatz 8 geht hervor, dass die Katalaselösung keine Aktivatoren enthält.

Die Warburgsche Coferment-Lösung enthielt Co-Zymase. Diese Verunreinigung kann das Ergebnis des Versuchs nicht geändert haben, da durch den Zusatz der Co-Zymase-Lösung, diese schon

VERSUCH XX.

Die Aktivierende Wirkung des Warburgschen Co-Ferments auf das „Atmungsenzym".

Enzyme: „Atmungsferment" aus Sauromantum (nach S. 110). 90 mgr in 10 ccm m/20. Phosphatpuffer pH = 6,8.
Katalase aus Sauromatum, nach Hennichs gereinigt. Kat. f. 8000. Enzymmenge: 17/ccm.

Aktivatore: „Acetonextrakt" aus Sauromatum:
Co-Zymase-Menge (auf Apozymase geprüft) 17,3 Co/ccm.
W. Co-Ferment-Menge (auf Monophosphorsäure-ester-Dehydrase geprüft) 1,5 Co-II/ccm.
Co-Zymase aus Hefe (nach § 7): 90 Co/ccm; ACo = 88000.
Warburgs Co-Ferment (nach § 7): 6 Co-II/ccm.

Lösung von Hexosemono- und diphosphorsaurem-Na. 2½%.
Phosphatpuffer m/20; pH = 6,8

	1	2	3	4	5	6	7	8
„Atmungsferment"	0,5 ccm	0,5 ccm	0,5 ccm	0,5 ccm	0,5 ccm	0,5 ccm	0,5 ccm	0,5 ccm
Katalase	0,2 „	0,2 „	0,2 „	0,2 „	0,2 „	0,2 „	0,2 „	0,2 „
„Acetonextrakt"	0,5 „	0,5 „	—	—	—	—	0,5 „	—
Co-Zymase	—	0,3 „	0,3 „	0,6 „	0,3 „	0,3 „	—	—
W.-Co-Ferment	—	—	—	—	0,3 „	0,6 „	0,3 „	—
Phosphorsäure-ester	0,5 „	0,5 „	0,5 „	0,5 „	0,5 „	0,5 „	0,5 „	0,5 „
Puffer	0,5 „	0,5 „	0,5 „	0,5 „	0,5 „	0,5 „	0,5 „	0,5 „
Wasser	0,4 „	0,1 „	0,6 „	0,3 „	0,3 „	—	0,1 „	0,9 „
O_2 Aufnahme nach								
10 Min.	14 cmm	16 cmm	6 cmm	5 cmm	13 cmm	15 cmm	14 cmm	—
20 „	26 „	28 „	11 „	11 „	27 „	28 „	27 „	—
30 „	38 „	38 „	16 „	17 „	39 „	40 „	40 „	—
40 „	49 „	47 „	20 „	22 „	51 „	49 „	51 „	—
50 „	59 „	57 „	25 „	27 „	62 „	59 „	61 „	0

in Überschuss vorhanden ist. Die Steigerung der O_2-Aufnahme mit 60% ist also auf Rechnung des Warburgschen Co-Ferments zu stellen.

Aus diesem Versuch ergibt sich, dass die aus dem Appendix isolierte Lösung der Aktivatoren in ihrer Wirkung identisch ist mit einem Gemisch von Co-Zymase und Warburgschem Co-Ferment. Man kann auch schliessen, dass in diesen Modellversuchen nicht die Co-Enzyme, sondern die Enzymsuspension die Geschwindigkeit der Oxydation bedingt, so wie das auch zu erwarten wäre.

Es wäre nun interessant zu wissen, wie gross der Anteil der Wirkung des Warburgschen Co-Ferments gewesen wäre, wenn ich keine Co-Zymase hinzugefügt hätte. Denn zweierlei ist möglich. Es liegt hier ein einzelnes Enzymsystem vor, dessen Aktivierung sowohl mit Co-Zymase wie mit der Co-Dehydrase II hervorgerufen werden kann, obschon am leichtesten mit der zuletztgenannten Substanz. Oder, — und diese Hypothese betrachte ich als die wahrscheinlichste —, die Enzymsuspension besteht aus einem Gemisch mehrerer Fermentsysteme, von denen ein Teil durch die Co-Zymase, und ein zweiter Teil durch das Warburgsche Co-Ferment ergänzt werden muss. Ich zeige im Abschnitt VII, dass wir die Enzymsuspension in mehreren Komponenten zerlegen können.

Da ich die Untersuchung über die Bedeutung des Warburgschen Co-Ferments für diese Atmungsversuche noch nicht abschliessen konnte, werde ich über weitere Experimente in einer folgenden Mitteilung berichten.

Die plötzlich auftretende Erhöhung der Atmungsintensität während der Entfaltung der Blütenkolben wird nicht dadurch verursacht, dass dem Appendix eine grosse Menge der Aktivatoren zugeführt wird. Die Geschwindigkeit der Verbrennungsreaktionen wird weder durch Zusatz von Co-Zymase, noch vom Warburgschen Co-Ferment erhöht (Versuch XIV und XXI).

VII. DIE DEHYDRASESYSTEME IM APPENDIX.

§ 21. Das Flavinenzym.

Das Flavin ist in allen untersuchten tierischen und pflanzlichen Zellen nachgewiesen worden. Zum grössten Teil liegt es an einem kolloiden Träger gebunden, als Enzym, vor. Nach allem was wir von den Fermentwirkungen im Sauromatum-

VERSUCH XXI.

Material: Appendix, einige Stunden vor dem Aufblühen (Anfang Wärme-Entwicklung).

Nährlösung: gleiche Teile einer 4%-igen Glucoselösung, einer 3%-igen Hexosemonophosphat-Lösung und einer 4%-igen Hexosediphosphat-Lösung.

Phosphatpuffer: 0,33 m., pH = 6,8.

Warburgsches Co-Ferment: 19 Co-II /ccm.

Gasraum: Sauerstoff.

	I		II		III	
Hauptraum:						
Gewebeschnitte	855 mgr		—		—	
Fein zerriebenes Gewebe	—		1340 mgr		2240 mgr	
Nährlösung	0,3 ccm		0,3 ccm		0,3 ccm	
Pufferlösung	0,2 ccm		0,2 ccm		0,2 ccm	
Co-Dehydrase II	—		—		0,2 ccm	
Wasser	1,6 ccm		0,2 ccm		—	
Einsatz:						
KOH	1 ccm		1 ccm		1 ccm	
ko_2	3,9		3,7		3,6	
	Gemessen	Berechnet pro 500 mgr Frischgewicht	Gemessen	Berechnet pro 500 mgr Frischgewicht	Gemessen	Berechnet pro 500 mgr Frischgewicht
O_2-Aufnahme nach						
10 Min.	39 cmm	23 cmm	60 cmm	22 cmm	95 cmm	21 cmm
20 „	78	46	122	45	184	41
30 „	115	66	180	67	268	60
40 „	152	89	228	85	357	80

Extrakt beobachteten, konnten wir erwarten, dass das Flavinenzym an mehreren dieser Reaktionen beteiligt ist. Diese Meinung hat sich als richtig erwiesen und ich werde in § 23 einige Beispiele dafür anführen.

Nach der Lumiflavin-Methode konnte ich nachweisen, dass der Appendix etwa 8 γ Flavin pro gr. Frischgewicht enthält, oder ungefähr 50—70 γ in 1 gr. Trockensubstanz. Vergleicht man diesen Wert mit den Flavinmengen, die in anderen Zellen vorhanden sind, so zeigt es sich, dass er einem relativ hohen Gehalt entspricht. EULER und Mitarbeiter finden in verschiedenen höheren Pflanzen 0,5 bis 1 γ pro gr. Frischgewicht, auf Trockengewicht berechnet etwa 5—10 γ (Spinat 8—10 γ; Gras 6 γ). In der Hefe befindet sich die Hälfte und in Milchsäurebakterien das Doppelte der Menge der Sauromatum-Kolben.

Das reichliche Vorkommen des Flavins könnte einen Hinweis dafür sein, dass es mit den Atmungsprozessen im Appendix in Zusammenhang stehen würde. Dieser Gedanke stützt sich gewissermassen auch darauf, dass es gerade in den Zellen der Rindenschicht in grossen Mengen vorkommt, während das Markgewebe und die anderen Teile der Pflanze nur wenig enthalten. Diese Meinung ist einstweilen noch eine Hypothese; es wird sich aber wohl bald zeigen lassen, ob das Enzym auch im normalen Atmungsprozess die Funktion eines Sauerstoffüberträgers übernimmt.

Auch die männlichen und weiblichen Blüten enthalten verhältnismässig grosse Flavinmengen.

Liegt das Flavin im Sauromatum vorwiegend in freier Form oder als Enzym vor? Die Beantwortung dieser Frage fordert die Trennung zwischen beiden Formen. Sie wird durch Dialyse nach den Methoden des Stockholmschen Biochemischen Institutes ausgeführt. (17, 29).

Die Zellen der Rindenschicht (± 20 gr Frischgewicht) werden unter starker Abkühlung mit Sand im Mörser zerrieben; die Extraktionen (5 Mal, je eine Stunde) wurden mit der 4-fachen Gewichtsmenge Eiswasser ausgeführt. Der Rückstand ist dann hellweiss. Die Lösungen werden vereinigt und nachher in zwei Hälften geteilt. In der einen Hälfte wird der gesamte Flavingehalt nach dem Vorschrift von § 7 bestimmt, während die zweite Hälfte zuerst aus dünnen Kollodiumhülsen gegen fliessendes Wasser 7 Stunden dialysiert und danach wie die erste Hälfte behandelt wird.

Der Versuch gibt das Verhältnis zwischen dem nicht dialysierbaren Flavin (dem Enzym) im Extrakt und der gesamten Flavinmenge. Diese Zahl ist nur dann bedeutend, wenn bei der Wasserextraktion fast alles sich löst. In meinen Versuchen enthielt der Rückstand, auf seinen Gehalt geprüft, nur ± 20 Prozent

der Menge. Auch wird bei diesen Bewirkungen kein Flavin vernichtet. Das Versuchsergebnis kann also verhältnismässig wenig beeinflusst werden von dem nicht extrahierten Teil. Die im Gewebe vorhandene Enzymmenge mag schon grösser, aber kaum geringer sein als der gemessene Wert, da während der Dialyse keine Synthese, sondern eine Spaltung des Ferments zu befürchten ist. In Versuch XXII gebe ich ein Beispiel.

Im Sauromatum-Kolben liegt fast alles Flavin als Enzym vor; seine Menge ist mindestens 94 Prozent. Ein so grosser Bruchteil wird nur bis zur Periode der maximalen Erwärmung aufgefunden; nachher nimmt er ab und schwanken die Messungen zwischen 30 und 60 Prozent. Ob diese Spaltung die direkte Folge der starken Temperatursteigerung ist, oder ob sie von andern Faktoren bedingt wird, ist zur Zeit nicht zu entscheiden. Ich gewann den Eindruck, dass diejenige äusseren Einflüsse, die die Atmungsintensität abändern, (vor allem Blütenentwicklung bei niedriger Temperatur) auch den Gehalt an gelbem Ferment variieren können.

Wie ich in § 24 näher zeigen werde, nimmt der Flavingehalt vor der Entfaltung der Blütenkolben zu; dabei bleibt das Verhältnis zwischen der gelben Ferment- und der totalen Farbstoffmenge praktisch konstant. Deshalb ist eine fortwährende Steigerung des Enzymwertes nachweisbar. Da nach der Entfaltung keine Flavinzunahme mehr zu verzeichnen ist, muss, nach obigem Versuch, der Enzymwert wieder abnehmen. Im grossen und ganzen betrachten wir also eine Schwankung in der Menge

VERSUCH XXII.

Das Verhältnis der Mengen des Flavinenzyms und des Gesamtflavins in der peripheren Schicht.

A. Appendix, ½ Tag vor der Erwärmung (3 Kolben).
18,6 gr, zerrieben und extrahiert nach S. 132).

Der Rückstand enthält	15 γ Flavin	(16% der totalen Menge)
Die nicht-dialysierte Hälfte der Flüssigkeitsmenge enthält .	40,9 γ Flavin	(Durchschnitt aus 3 Messungen)
Die dialysierte Hälfte der Flüssigkeitsmenge enthält .	38,4 γ Flavin	(„ „ 3 „)

Gehalt an Flavinenzym: 94%.

B. Appendix, ¾ Tag nach der Erwärmung (2 Kolben).
13,3 gr, zerrieben und extrahiert wie oben.

Der Rückstand enthält	9 γ Flavin	(12% der totalen Menge)
Die nicht-dialysierte Hälfte der Flüssigkeitsmenge enthält ..	35 γ Flavin	
Die dialysierte Hälfte der Lösung enthält	19 γ Flavin	

Gehalt an Flavinenzym: 54%.

des gelben Ferments, die, — allerdings nur qualitativ —, dem Atmungswechsel parallel geht.

Beeinflusst das Flavinenzym die Geschwindigkeit der Oxydationsreaktionen? Durch Zusatz des Ferments zum lebenden Gewebe ist das Problem nicht zu lösen, da es nicht in die Zellen hineindringt. Arbeitet man mit Gewebebrei, so gewinnt die Frage an Bedeutung. Man könnte sich nähmlich denken, dass die Dehydrierungssysteme ihre maximale Aktivität wegen eines Defizits an gelbem Ferment nicht entfalten.

Fügt man es zum zerriebenen Appendix hinzu, so bleibt die Dehydrierungsgeschwindigkeit des Robisonesters unverändert (Versuch XXIII). Die zugefügte Menge wählte ich derart, dass die Konzentration 4 mal so gross wurde. Zum Nachweis einer Aktivitätsänderung genügt das bestimmt.

Obwohl wir keine Differenzen in der Sauerstoffaufnahme beobachteten, soll das nicht heissen, dass das Enzym keine Rolle bei den Verbrennungsreaktionen spielen könnte. Seine Konzentration ist in den Pflanzen schon so gross, dass wir der Möglichkeit Rechnung tragen müssen, dass es in Überschuss anwesend ist und die Oxydationsgeschwindigkeit nicht reguliert.

Ich füge noch hinzu, dass die Versuche nur während des Stadiums der maximalen Erwärmung ausgeführt worden sind; ob dasselbe Ergebnis auch für anderes Material zutrifft, ist unbekannt.

VERSUCH XXIII.

Material: Die gelbe Gewebeschicht während der Erwärmung; sie enthält 7,4 γ Flavin pro gr Frischgewicht.
Methodik: Manometrische O_2-Messung. Anfang der Messungen sofort nach dem Umkippen der Gefässe.
Hauptraum: 0,2 ccm 4% Hexosemonophosphorsaures-Na.
0,3 ccm 0,1 m Phosphatpuffer, pH = 6,7
I: 67 mgr bei Gefriertemperatur zerriebenes Gewebe.
II: 63 mgr „ „ „ „
Anhang: I: Wasser
II: Flavinenzym (2,1 γ der Farbstoffkomponente).
Einsatz: 0,3 ccm 5% KOH.

	I	II
O_2-Aufnahme in 15 Min.	37 cmm	36 cmm
30 „	72	70
45 „	106	103
60 „	136	131

§ 22. **Die Dehydrasen der Sauromatum-Kolben.**

Es fragt sich jetzt, welche Dehydrierungsreaktionen im Appendix nachweisbar sind. Dazu brauchen wir die Enzyme, getrennt von ihren Donator-Substanzen, und untersuchen wir, welche Stoffe sie angreifen.

Die Thunberg-Methodik wird benutzt unter Anwendung von Methylenblau als Wasserstoffacceptor. Gemessen wird die Entfärbungszeit bis einer ganz minimalen Blaufärbung. Der Zeitpunkt der absoluten Entfürbung war sehr schwer zu erkennen, da die verwendeten Präparate nicht farblos sind.

Es bleibt bei dieser Versuchsanordnung immerhin möglich, dass ein Dehydrierungssystem schon anwesend ist, doch nicht nachgewiesen werden kann, weil das Methylenblau keinen geeigneten Acceptor ist.

Als Enzympräparat verwendete ich die Aceton-Methanol Fällung (S. 110), die durch Dialyse während einiger Zeit weitgehend von den Co-Fermenten befreit ist. Da bei der Isolierung des Materials vielleicht Enzyme vernichtet und notwendige Aktivatore entfernt worden sind, ist einem negativen Ergebnis dieser Versuche nur einen geringen Wert beizumessen. Zerriebenes Gewebe, ohne jede Behandlung sofort zu verwenden, hat keinen Zweck wegen der grossen Mengen Donator-Substanzen, die der Appendix enthält.

Eine Trennung zwischen dem gelben Ferment und den Dehydrasen konnte nicht vorgenommen worden. Das Präparat enthält eine so grosse Flavinmenge, dass sie wahrscheinlich zur maximalen Aktivierung vollauf genügt. Man kann daher mittels seines Zusatzes nichts erfahren über dessen Bedeutung für den Dehydrierungsvorgang. Deshalb wurde, um sicher zu sein, dass die maximale Umsatzgeschwindigkeit erreicht wurde, zu allen Ansätzen gelbes Ferment gefügt.

Die Versuche sind ausgeführt worden mit und ohne Co-Ferment-Zusatz.

Das Enzympräparat zeigt keinen nachweisbaren Umsatz der folgenden Substanzen: Ameisensäure, Bernsteinsäure, Citronensäure, Glukose, und Glykokoll; die Säuren wurden mit NaOH neutralisiert. Bei diesen Versuchen liegen die Differenzen der Entfärbungszeiten mit und ohne Donatorsubstanz in die Versuchsfehler. Dass die Präparate auch ohne jeden Stoffzusatz reagieren, beweist, dass sie nicht völlig von dehydrierbaren Substanzen befreit waren. Weder mit Co-Zymase, noch mit dem Warburgschen Co-Ferment erzeugten die untersuchten Stoffen eine Ent-

färbung des Methylenblaus; auch nicht wenn ich die Wasserstoffionenkonzentration variierte.

Eine stark positive Wirkung haben Alkohol, Robisonester und Hexosediphosphorsäure. Diese drei Dehydrasen konnte ich in reinerer Form isolieren; ich werde ihre Reaktionen im nächsten Paragraph besprechen.

Weiter wurden noch untersucht: Milchsäure, Essigsäure, Acetaldehyd und Neuberg-Ester. Die Wirkung der beiden zuerst genannten Substanzen ist eine sehr schwache, der dritte Körper hat einen grösseren Einfluss. Ob es sich um eine einzige Dehydrase handelt, die jeden der vier Stoffen dehydrieren kann, — sei es auch mit verschiedener Geschwindigkeit —, oder ob vier verschiedene Systeme vorliegen, ist aus diesen Versuchen nicht zu schliessen. Die zweite Hypothese kommt mir am wahrscheinlichsten vor.

In Gegenwart von den drei zuerstgenannten Donatoren wird Methylenblau durch das Enzympräparat nur dann reduziert, wenn Co-Zymase zugefügt war. Auch Co-Dehydrase II hat eine ganz schwache Wirkung. Ich möchte die Aktivierung, vom wasserstoffübertragenden Co-Ferment hervorgerufen, einer Verunreinigung mit Co-Zymase zuschreiben. Denn die Dehydrierungsgeschwindigkeit mit Co-Dehydrase II ist nur wenig grösser als die Geschwindigkeit mit reiner Co-Zymase, wenn beide Aktivatorlösungen, auf die Alkoholdehydrase geprüft (§ 7), dieselbe Co-Zymase Menge enthalten. Obschon diese Beobachtung noch kein endgültiger Beweis für die Unwirksamkeit des wasserstoffübertragenden Co-Ferments ist, so wird sie mit dieser Annahme am leichtesten erklärt. Die Dehydrierung des Neuberg-Esters erfordert Co-Dehydrase II.

In der Natur liegen zwei Gruppen von Milchsäuredehydrasen vor. Die Enzyme der ersten Gruppe werden durch Co-Zymase aktiviert. So die Extrakte aus getrockneter Oberhefe (8) und Muskelfleisch (14). Dagegen ist Co-Zymase ohne jeden Einfluss auf die Enzyme der zweiten Gruppe, wie das Extrakt aus getrockneter Unterhefe (14). Wie diese Differenzen zu erklären sind, ist noch völlig unbekannt. Die Milchsäuredehydrase der Sauromatum gehört zu der zuerstgenannten Enzymgruppe (Versuch XXIV).

Für die enzymatische Umwandlung des Acetaldehyds ist die Anwesenheit der Co-Zymase notwendig. Diese Beobachtung wurde schon von Nilsson (Zymase-Präparat) und von Euler und Brunius (Leberenzym) gemacht.

Bezüglich seiner grossen Dehydrierungsgeschwindigkeit kön-

VERSUCH XXIV.

Enzympräparat: 1 gr Aceton-Methanol Fällung (S. 110) in 20 ccm Phosphatpuffer pH = 6,4 klar zentrifugiert — Co-Dehydrase II: 24 Co-II Einheiten und 7 Co-Zymase Einheiten pro ccm. — Co-Zymase: 78 Co pro ccm. — Substrat: 0,5 mol Lösung. — Methylenblau: 1 : 5000, 0,5 ccm. — Die Ansätze enthalten ausserdem noch Flavinenzym (3,4 γ Flavin).

Die Versuche sind zum Teil mit verschiedenen Enzympräparaten ausgeführt worden.

A. Na-Laktat.

Enzym	Co-Dehydrase II	Co-Zymase	Co-Zymase 8 Co/ccm	Substrat	Wasser	Entfärbungszeit in Min.
1 ccm	—	—	—	1 ccm	0,5 ccm	170
1 „	0,25 ccm	—	—	1 „	0,25 „	120
1 „	—	—	0,25 ccm	1 „	0,25 „	110
1 „	—	0,5 ccm	—	1 „	—	70

B. Na-Acetat.

Enzym	Co-Dehydrase II	Co-Zymase	Co-Zymase 8 Co/ccm	Substrat	Wasser	Entfärbungszeit in Min.
1,5 ccm	—	—	—	0,5 ccm	0,5 ccm	240
1,5 „	0,25 ccm	—	—	0,5 „	0,25 „	160
1,5 „	—	—	0,25 ccm	0,5 „	0,25 „	180
1,5 „	—	0,5 ccm	—	0,5 „	—	110

C. Acetaldehyd.

Enzym	Co-Dehydrase II	Co-Zymase	Co-Zymase 7,4 Co/ccm	Substrat	Wasser	Entfärbungszeit in Min.
1 ccm	—	—	—	—	1,5 ccm	> 2½ Stunden
1 „	—	—	—	1 ccm	0,5 „	140
1 „	0,25 ccm	—	—	1 „	0,25 „	80
1 „	—	—	0,25 ccm	1 „	0,25 „	60
1 „	—	0,5 ccm	—	1 „	—	30

D. Neuberg-ester.

Enzym	Co-Dehydrase II	Co-Zymase	Substrat	Wasser	Entfärbungszeit in Min.
1 ccm	—	—	0,5 ccm	0,5 ccm	160
1 „	0,5 ccm	—	0,5 „	—	80
1 „	—	0,5 ccm	0,5 „	—	150

nen wir folgendes feststellen. Acetaldehyd kann in zweierlei Weisen umgewandelt werden. Erstens kann das Präparat eine aktive Aldehyd-Dehydrase enthalten; zweitens kann eine Mutase mitwirken. Das zuletzterwähnte Enzym bewerkstelligt die Canizzaro-Reaktion der einfachen Aldehyde; hier sollten Alkohol und Essigsäure gebildet werden. Da von diesen Reaktionsprodukten der Alkohol rasch dehydriert wird, könnte die intensieve Dehydrierung des Acetaldehyds auch auf diesem Wege zustande kommen. Eingehende Untersuchungen von EULER, MYRBÄCK, BRUNIUS, u.a. (36) stellten ausser Zweifel, dass die Mutase nur in Gegenwart von Co-Zymase wirksam ist.

Die Reaktionsprodukte der Enzymwirkungen sind nicht isoliert worden. Ebenfalls unterliess ich es zu untersuchen, ob alle Dehydrierungsreaktionen in Gegenwart von Sauerstoff, statt des Methylenblaus, vorfinden. Ich konnte nachweisen, dass dieser Fall für die Dehydrierung von Aldehyd zutrifft.

§ 23. Die Dehydrierung von Hexosemono- und diphosphorsäure und von Alkohol.

Im Folgenden berichte ich über die Trennung und Isolierung der Hexosemono- und diphosphorsäure-Dehydrasen und der Alkoholdehydrase aus Sauromatum. Die Trennung war nicht vollständig; auch erhielten die Präparate noch Flavinenzym. Es gelang jedoch diese Menge so weit zu vermindern, dass die Aktivität der Dehydrase-Lösungen mittels Zusatz des Enzyms stark gesteigert wurde.

Der Aceton-Niederschlag (5 gr.) wird gegen kaltes Wasser dialysiert; die sich bildende Fällung wird nicht entfernt. Danach fällte ich die Flüssigkeit wieder mit Aceton und extrahierte den Niederschlag mit 20 ccm m/15 Phosphatpuffer pH = 6,6 durch schütteln. Vom Ungelösten wird abzentrifugiert und die Flüssigkeit wird mit dem 20-fachen Volumen Wasser verdünnt. Einen Vorschlag von WARBURG und CHRISTIAN folgend, kühlte ich die Lösung stark ab und sättigte sie bei 0° mit Kohlensäure. Das Zwischenferment fällt aus, das Flavinenzym nur in geringen Masse. Der Niederschlag wird mit der Hälfte des ursprünglichen Volumens Pufferlösung (pH = 7,4) extrahiert und kalt zentrifugiert. Es ist möglich den Reinigungsversuch zu wiederholen.

Die Lösung enthält die Hexosemono- und diphosphorsäure-Dehydrasen. Sie wirken allerdings nur nach Zusatz eines Co-Ferments und des Flavinenzyms. Es erübrigt sich die Fermente ausfürlich zu beschreiben, da sie sich nicht von den aus anderem Ausgangsmaterial isolierten Enzymen unterscheiden.

A. *Robisonester-Dehydrase.* Genau so wie in den Versuchen von WARBURG und CHRISTIAN mit dem Zwischenferment der Hefe

ist das Enzym dadurch ausgezeichnet, dass es die Oxydation des Phosphorsäure-esters in Gegenwart des wasserstoffübertragenden Co-Ferments zu aktivieren vermag. In Übereinstimmung mit den Angaben von EULER und ADLER braucht die Dehydrierung keine Mitarbeit der Co-Zymase. Blausäure hemmt die Reaktion nicht. Wir müssen also annehmen, dass die Dehydrase dem Zwischenferment identisch ist, oder ihm jedenfalls sehr nahe steht.

B. *Hexosediphosphorsäure-Dehydrase.* Auch diese Dehydrase befindet sich in der Enzymlösung. In Bezug auf die Mitarbeit eines Co-Ferments sind die Versuche nicht ganz klar. Sowohl die Co-Zymase wie das Warburgsche Co-Ferment wirken aktivierend; die erstere kräftiger als das letztere. Das Warburgsche Co-Fermentpräparat war nicht frei von Co-Zymase. Ich muss also nochmals auf die Möglichkeit hinweisen, dass eben diese Verunreinigung vielleicht die Aktivierung verursacht haben könnte. Gegen diese Auffassung wäre einzuwenden, dass die Entfärbungszeit des Methylenblaus im Falle des wasserstoffübertragenden Co-Ferments zwar nicht viel, doch nachweisbar kürzer ist als die einer reinen Co-Zymase-Lösung, wenn beide Lösungen die gleiche Wirkung auf die Alkoholdehydrase der Hefe hatten. Daraus könnte man schliessen, dass das Warburgsche Co-Ferment nicht völlig indifferent ist gegenüber diese Dehydrierung. Es wäre jedoch besser das Resultat näherer Versuche mit reinen Co-Dehydrase II-Präparaten abzuwarten, da die bis jetzt verwendeten Lösungen noch Stoffen enthalten können, welche die Dehydrierungsgeschwindigkeit der Alkohol- und Hexosediphosphat-Dehydrase in ungleichem Masse beeinträchtigen können. Diese Möglichkeit dürfen wir bei unseren Versuchen nicht ausser Betracht lassen.

Die zwei oben erwähnten Dehydrasen sind verschiedene Enzyme und nicht ein einziges Ferment, das auf die Dehydrierung beider H-Donatoren eingestellt ist. Erstens ergibt sich dies aus der Tatsache, dass an dem unter A genannten System nur das wasserstoffübertragende Co-Ferment beteiligt ist, während an dem unter B erwähnten System auch die Co-Zymase mitwirkt. Zweitens könnte man diese Folgerung ziehen aus der Beobachtung, dass der Gehalt der Präparate an beiden Fermenten so sehr abweichen kann. Bisweilen enthält man Lösungen, die fast nur die eine Wirkung zeigen, während die andere nur schwach angedeutet ist. Diese Erscheinung ist auf ungleich grosse Verluste bei der Isolierung zurückzuführen. Drittens zeigt der Inaktivierungsversuch folgendes: die Aktivität der Lösung nimmt bei Zimmertemperatur ab. Dabei bleibt die Wirkung der Robi-

sonester-Dehydrase relativ am längsten behalten; die Diphosphorsäure-Dehydrase ist bald völlig verschwunden.

C. *Alkohol-Dehydrase.* Eine Lösung der Alkohol-Dehydrase wurde in folgender Weise erhalten.

Nachdem der Appendix fein zerrieben und mit Eiswasser extrahiert ist, wird der Extrakt bei 0° mit Alkohol gefällt. Die Alkoholkonzentration steigt nicht über 55% hinaus. Der Niederschlag wird abzentrifugiert, in 10 ccm Eiswasser gelöst und das Ungelöste entfernt. Die Alkoholfällung wird wiederholt und der Rückstand zuletzt in Phosphatpuffer (pH = 6,6,) gelöst und klar zentrifugiert.

Da diese Lösung nicht vollständig vom Aktivator und gelben Ferment befreit ist, entfärbt sie Methylenblau schon ohne deren Zusatz in geringem Masse. Die Dehydrierungsgeschwindigkeit wird mit Co-Zymase und Flavinenzym stark erhöht. Wie bei der Alkohol-Dehydrase der Hefe hat das wasserstoffübertragende Co-Ferment keine grössere Wirkung, wie man es nach seinem Gehalt an Co-Zymase erwarten könnte. Daraus kann man schliessen, dass auch hier die Co-Dehydrase II wirkungslos ist.

Das Ferment wird, in Übereinstimmung mit den Angaben von EULER und ADLER, nicht von Blausäure gehemmt.

§ 24. Die Konzentrationsänderungen des Flavins und der Co-Zymase während der Entwicklung.

Nachdem ich in den vorangehenden Paragraphen über das Vorkommen von Enzymsystemen und ihren Aktivatoren berichtet habe, folgt jetzt der erste Teil einer systematischen Untersuchung über ihre Konzentrationsänderungen während der Entwicklung der Sauromatum-Kolben. Es handelt sich um Messungen der Co-Zymase- und Flavinmengen.

Vorversuche haben gezeigt, dass nicht nur die absoluten, sondern auch die relativen Mengen der untersuchten Substanzen in den verschiedenen Pflanzen variieren. Deshalb sollte auf eine möglichst grosse Homogenität des Materials besonderer Wert gelegt werden (S. 94). Die Anzahl der mir zur Verfügung stehenden Pflanzen war so gering, dass kein richtiger Mittelwert berechnet werden konnte. Dazu wären für jeden Wert mindestens 15 Einzelmessungen notwendig. Da die Lebensbedingungen der Pflanze die Entwicklungsgeschwindigkeit und die chemische Zusammensetzung der Appendices beeinflussen, möchte ich ausdrücklich betonen, dass die erhaltenen Werte der absoluten Mengen der untersuchten Substanzen nicht allgemein gültig sind. Der Vergleich der Mengenverhältnisse ist für jeden Versuch immer erlaubt, obschon auch sie keine konstanten Grössen sind.

In Tabelle XXV gebe ich die Messungen eines Versuches wieder. Alle Werte sind pro gr Frischgewicht berechnet worden. Da ebenfalls das Frischgewicht und Trockengewicht der gelben Rindenschicht bestimmt wurden, können wir die Ergebnisse auf diese Grössen beziehen. Der Versuch ist 3 Mal wiederholt worden; ich beschreibe nur die Erscheinungen, die alle Versuche gemein hatten.

Die Co-Zymasemenge im Appendix nimmt während der Entwicklung zu. In 4 Tagen hat sich ihre Menge um das 7-fache vermehrt. Nach der Erwärmung nimmt sie schnell ab um nach 2 Tagen fast völlig verschwunden zu sein. Diese Aktivitätsverringerung kann nur teilweise der Bildung der Hemmungskörper (S. 125) zugeschrieben werden.

Sind die Co-Zymase und der Hemmungskörper isoliert in den Zellen vorhanden, so ist die Co-Zymase-Bestimmung nicht richtig; es wäre erforderlich beide zu trennen. Eine Methode, den hemmenden Stoff quantitativ zu entfernen, ist nicht bekannt. Sind sie jedoch beide in der Zelle anwesend, so hat man die Wirkung der Summe der Aktivatoren und Paralysatoren bestimmt und diese ist für die Stoffwechselgrösse der Zellen am wichtigsten.

Es tritt also eine erhebliche Schwankung der Co-Fermentmenge hervor, die der Atmungsschwankung zwar qualitativ ähnlich ist, jedoch quantitativ nicht mit ihr übereinstimmt. Während z.B. die Sauerstoffaufnahme in Versuch XXV um das 32-fache zunimmt, steigt die Co-Zymasemenge nur mit 240% (pro gr Frischgewicht). Nach § 19 bedingt Co-Zymase die Oxydationsgeschwindigkeit, während des Stadiums der maximalen Erwärmung, nicht. Wir können diese Folgerung jetzt erweitern und schliessen, dass Co-Zymase die Atmungsgeschwindigkeit im Sauromatum-Kolben nie reguliert.

Nur der Gesamtflavingehalt wurde bestimmt und die Verteilung in freies und an einem ligatorischen Teil gebundenes Flavin ist nicht näher berücksichtigt. Wir wissen, dass vor der Entfaltung fast alles Flavin als Enzym vorliegt (§ 21); wir machen nur einen geringen Fehler, wenn wir den freien Teil vernachlässigen.

In 4 Tagen nimmt die Flavinmenge von $\pm$ 3 γ bis auf 95 γ zu (pro Appendix). Ob es in den Zellen der Rindenschicht aus den einfachsten Bestandteilen synthetisiert wird oder ob eine Flavinwanderung aus den Knollen zum Appendix möglich wäre, ist nicht bekannt. Beim Vergleich der O_2-Aufnahme und der Flavinmenge (pro gr Frischgewicht) ergibt sich, dass erstere um das 32-fache und die zuletzt genannte um das 13-fache steigt.

VERSUCH XXV *).

Co-Zymase und Flavinbestimmungen im Rindengewebe.

(Die Werte stellen aus mehreren Analysen errechnete Mittelwerte dar).

	Entwicklungsstadium	Anzahl der untersuchten Kolben	Appendix-Länge (mm)	Frischgewicht des Rindengewebes (gr.)	Trockengewicht (% des Frischgewichts)	Berechnet pro gr Frischgewicht: Atmung (ccm O_2/Stunde)	Berechnet pro gr Frischgewicht: Co-Zymase Einheiten	Berechnet pro gr Frischgewicht: Flavin (γ Lumiflavin)	Berechnet pro Appendix: Co-Zymase Einheiten	Berechnet pro Appendix: Flavin (γ Lumiflavin)	„Wechselzahl"
1	4 Tage vor Entfaltung der Blüten	3	125, 143, 162	10,6	19,3	0,20	5,2	0,9	18	3	43
2	2 Tage vor Entfaltung der Blüten	2	230, 274	21,1	14,4	0,37	6,2	1,8	65	19	40
		2	275, 263	25,3	15,1	0,32	5,5	1,8	70	23	35
3	Entfaltung der Blüten (Anfang)	3	250, 280, 286	37,7 (Spitze: 16,5)	10,9	6,5	12,5	11,4	125	95	110
				(Basis: 21,2)	10,8	3,3	8,0	4,6			137
4	24 Stunden später	3	290, 302, 306	35,0 (Spitze: 19,5)	10,9	0,32	5,3	9,4	43	91	—
				(Basis: 15,5)	11,4	0,53	1,9	5,9			—
5	2 Tage nach Entfaltung der Blüten	2	298, 313	20,8	7,8	0,69	0,16	2,9	17	29	—

*) Die selben Pflanzen wie in Versuch IX.

In Zusammenhang mit Versuch XXIII ist aus diesem Versuch zu schliessen, dass die Intensität der Atmung während der ganzen Entwicklung unabhängig ist von der Menge des Flavinenzyms.

Nach dem Atmungsmaximum hat der Vergleich der Atmungswerte mit den Co-Ferment- und Flavinmengen keine Bedeutung. Die Atmungsfermente sind ungesättigt und die Reaktionsgeschwindigkeit ist abhängig von der Menge des Verbrennungsmaterials.

Auf eine Erscheinung möchte ich noch hinweisen: in allen drei Versuchen zeigte sich, dass die Appendix-Spitze einen höheren Gehalt an Co-Zymase und Flavin hat als der Basis. Das Verhältnis: Spitze-Basis schwankte; das geht schon daraus hervor, dass die Wahl der Spitzenlänge willkürlich ist. Es hängt nicht mit der Atmungsintensität zusammen; nach Zeile 3 ist die Atmung im oberen Teil am grössten; 1 Tag später (Zeile 4) ist sie am kleinsten. In beiden Fällen ist der Co-Ferment- und Flavingehalt in der Spitze am grössten.

Wir dürfen diese Erscheinung wohl damit in Zusammenhang bringen, dass die intensivste Atmung der Spitze des Organs immer stärker ist als die maximale Atmung des basalen Teiles (vgl. Versuch V).

§ 25. Die Wechselzahl.

Ist das Flavinenzym an einer der Teilreaktionen des Atmungsprozesses der Sauromatum-Kolben beteiligt?

Da die Atmungsgeschwindigkeit des zerriebenen Appendix-Gewebes sich nicht ändert durch Zusatz des Enzyms, bleibt die spektroskopische Untersuchung der lebenden Zellen die einzige Möglichkeit des direkten Nachweises seiner Mitarbeit. Diese Versuche, die den bekannten Experimenten von Warburg und Christian (141) mit Milchsäurebakterien ähnlich sein sollten, konnten noch nicht ausgeführt werden.

In indirekter Weise, mittels Bestimmung der Wechselzahl (S. 81), können wir jedoch wichtige Schlussfolgerungen bekommen. Einen annährend richtigen Wert dieser Zahl habe ich aus den Messungen des Versuchs XXV errechnet und in der Tabelle eingetragen. Ich bemerke, dass ich den Berechnungen die totale Flavinmenge, statt der Enzymmenge, zugrunde legte. Berücksichtigen wir das Ergebnis von § 21, so ergibt sich, dass die errechnete Zahl aus den Versuchen vor der Entfaltung der Kolben ± 6% zu niedrig ausfällt; ein Fehler, den wir wohl vernachlässigen dürfen. Aus dem Material, nach der Blüten-

entfaltung gesammelt, dürfen wir keine Wechselzahl berechnen: erstens ist das gelbe Ferment ein geringerer Bruchteil der Gesamtflavinmenge und zweitens entspricht die gemessene Sauerstoffaufnahme nicht dem Sättigungsgrad des Atmungsfermentes. Beide Faktore erzeugen einen zu niedrigen Wert. Ausserdem variieren sie unabhängig voneinander; ihr Verhältnis zeigt grosse unregelmässige Schwankungen.

Die Wechselzahl beträgt vor der starken Atmungserhöhung etwa 40—50; in der Periode der intensivsten Atmung steigt sie bis ungefähr 140 (Versuch XXV). Da eben die zuletzterwähnte Bestimmung von grösster Bedeutung ist, habe ich sie durch mehrere Messungen zu gründen versucht. Die erhaltenen Werte fasse ich in der Tabelle XXVI zusammen. Hier wurde den richtigen Wert der Wechselzahl bestimmt, da ich den Enzymgehalt gemessen habe.

Der höchste Wert der Wechselzahl, in Modellversuchen erhalten, ist 55; d.h. das gelbe Ferment kann unter den günstigsten Bedingungen jede Minute 55 Mal reduziert und oxydiert werden. Wäre das Ferment ein notwendiger Überträger der ganzen von der Zelle aufgenommenen Sauerstoffmenge, so kann die aus der Atmung errechnete Wechselzahl nie über diesen Wert hinaus steigen. Vergleichen wir diese Angabe mit den oben mitgeteilten Zahlen, so schliessen wir, dass vor der Blütenentfaltung die in der Rindenschicht vorhandene Enzymmenge genügt um allen Atmungssauerstoff zu übertragen. Zwar müsste die Übertragung dann mit fast maximaler Geschwindigkeit stattfinden und wäre vielleicht ein geringer Einfluss des Enzymzusatzes zu erwarten. Die Beobachtung schliesst aber die Mitarbeit des gelben Ferments an den Atmungsvorgang nicht aus.

VERSUCH XXVI.

Material: Blühende Kolben (Maximum der Erwärmung), periphere Gewebeschicht (Gasraum: Sauerstoff).

	Atmung ccm O_2 pro Stunde und gr Frischgewicht.	Flavinenzym gemessen in Lumiflavin und pro gr Frischgewicht.	Wechselzahl
1.	6,5	15,4	80
2.	3,2	3,4	165
3.	5,6	8,9	119
4.	9,7	13,4	138
5.	3,5	6,2	108
6.	4,8	7,8	117

Der Versuch beweist, dass bei der grössten Atmungsgeschwindigkeit das Flavinenzym nicht das einzige sauerstoffübertragende Ferment ist, da sonst die errechnete Wechselzahl (80—165) den Höchstwert im Modellversuch (55) um das 2 bis 3-Fache übersteigen würde. Das heisst, dass das gelbe Ferment maximal $^1/_2$—$^1/_3$ Teil des Atmungssauerstoffs transportieren kann. Mit Rücksicht auf der Beobachtung, dass es in Überschuss vorhanden ist, dürfen wir schliessen, dass der Flavinteil der O_2-Übertragung sicher geringer ist als $^1/_3$ Teil. Andere Enzymsysteme, die bis jetzt noch nicht erforscht wurden, haben eine grössere Bedeutung.

Der Teil der Atmung, der über das gelbe Ferment verlaufen könnte, ist jedoch quantitativ nicht bedeutungslos. M.W. liegt hier das erste bekannte Beispiel vor, bei der das Flavinenzym ein so grosser Anteil an den Verbrennungsreaktionen einer höheren Pflanze haben könnte. Diese Tatsache ist um so merkwürdiger, wenn wir in Betracht ziehen, dass es sich um eines der intensivst atmenden Pflanzenorganen handelt.

Betrachten wir in diesem Zusammenhang noch die Einwirkung des Enzympräparates aus der Rindenschicht (S. 110) auf Hexosmonophosphorsäure. Bei dieser Reaktion können wir sagen, dass das Flavinenzym ein wirksamer Bestandteil des Präparates und in Überschuss vorhanden ist.. Die Wechselzahl der verschiedenen Präparate schwankt stark; sie zeigt im allgemeinen einen zu grossen Wert (29 bis 84). Daraus geht hervor, dass entweder die durch die Einwirkung des Co-Ferment-Flavinenzymsystems gebildete Phosphohexonsäure weiter oxydiert wird oder dass der Robisonester teilweise sofort von einem anderen Fermentsystem angegriffen wird; bei diesen beiden Reaktionen konnte das gelbe Ferment keine Rolle als sauerstoffübertragendes Ferment spielen.

Vor einigen Jahren konnten Badenhuizen und ich nachweisen, dass Blausäure die Verbrennungsreaktionen im Sauromatum-Kolben hemmt. Es zeigte sich jetzt, dass diese Substanz dieselbe Wirkung hat auf der Umsatz des Robisonesters durch das Acetondauerpräparat, sei es in viel geringerem Masse. Da HCN bekanntlich die Oxydation des Esters zu Phosphohexonsäure nicht hemmt, weist auch dieser Versuch auf das Vorhandensein mehrerer oxydierenden Fermente im Präparat hin.

VIII. DISKUSSION DER ERGEBNISSE.

In diesem letzten Abschnitt möchte ich etwas tiefer eingehen auf die Versuchsergebnisse.

Im erwachsenen Appendix ist die Atmungsintensität anfangs

gering; plötzlich steigt sie zu einem, für pflanzlichen Zellen, extrem hohen Wert an und nimmt dann wieder schnell ab. Sie ist oben und unten an der Keule nicht gleich: zuerst ist sie oben grösser als unten; nachher ist das Umgekehrte der Fall, da das Atmungsmaximum von oben nach unten verschiebt. Die periphere Gewebeschicht ist der Sitz dieser intensiven Verbrennungsprozessen ($Qo_2 = 20$ bis 40), während die Zellen des zentralen Gewebes nur schwach atmen ($Qo_2 = 2$). Diese Ergebnisse stimmen vollkommen überein mit den Befunden älterer Forscher; zum Teil stellen die Experimente eine Wiederholung der früher von BADENHUIZEN und mir ausgeführten Versuche dar.

Dass innerhalb dieses regelmässigen Verlaufes noch Schwankungen auftreten, versteht sich. Solche Ungleichheiten werden teils durch nicht näher bekannte, innere Zustände jedes Individuums hervorgerufen, zum Teil sind sie auch abhängig von äusseren Ursachen. Von diesen will ich nur hervorheben: eine starke Temperaturerniedrigung kurzer Zeit vor oder während des Aufblühens, eine künstliche Verzögerung der normalen Blütenzeit bis Anfang Mai und eine Verletzung des Anhängsels.

Es gibt grosse Unterschiede, nicht nur zwischen den einzelnen Kolben, sondern auch zwischen verschiedenen Teilen eines Kolbens. Erstere konnte ich durch eine scharfe Auswahl der Pflanzen nach Grösse und Entwicklungsgeschwindigkeit verringern, die zweiten eliminierte ich mittels Untersuchung vieler dünnen Gewebeschnitte aus mehreren Teilen der peripheren Appendixschicht.

Voraussetzung für alle Atmungsversuche ist die hinreichende Sauerstoffversorgung. Denken wir uns den Inhalt der Zellen als reines Wasser, so können sie nicht mehr Sauerstoff lösen, als ausreicht um den Bedarf etwa 5 Sekunden zu decken. Ob und wieviel chemisch gebundener Sauerstoff daneben noch existiert, der in der Atmung verbraucht werden kann, ist nicht bekannt.

Das aktive Gewebe ist 1 bis 2 mm dick. Es fragt sich, ob seine Sauerstoffversorgung unter diesen Verhältnissen genügend gesichert ist. Um die Frage zu lösen, wurde die Atmung grösserer Appendix-Stücke mit der dünnerer Gewebeschnitte verglichen. Die Dicke der Querschnitte wurde so gewählt, dass ihre Atmung niemals vom Sauerstoffmangel beeinträchtigt wird. Zwischen den beiden Versuchen war fast kein Unterschied zu beobachten (Differenz: 10—20%). Also wird der Sauerstoff den Zellen mit genügend grosser Geschwindigkeit durch die Spaltöffnungen u.s.w. zugeführt.

Weiter beweist der Versuch, dass der Stoffwechsel der Schnitte, auch in quantitativer Richtung, gegenüber dem normalen intakten Organ nur unwesentlich verändert sein kann. Die Atmung ist mehrere Stunden konstant bei genügender Zufuhr von Verbrennungssubstanzen (wenn wir den Inhalt der zerschnittenen Zellen zuvor entfernt haben!). Allzu feine Zerschneidung führt zu einem Nachlassen der Atmung im Verlauf von ½ bis einer Stunde. Eine neutrale Phosphatlösung ist die günstigste Suspensionslösung.

Die Atmung ist verhältnissmässig unabhängig von der Sauerstoffkonzentration.

Gelegentlich beobachtete ich eine intensivere Atmung in Schnitten als in längeren Appendixstücken. Ob dieses Phänomen auf eine unzureichende Sauerstoffversorgung des Kolbens oder auf eine Reizung der Zellen bei der Präparation zurückzuführen ist, lässt sich nicht entscheiden.

Grobe Schädigungen und Verletzungen der Kolben erniedrigen allgemein die Appendix-Atmung beträchtlich, wahrscheinlich durch Austrocknen infolge der gesteigerten Transpiration.

Der respiratorische Quotient ist vor dem Aufblühen ungefähr 1. Der Durchschnitt aller Versuche betrug 0,97, bei Schwankungen von 0,94 bis 1,01. Es ist gut möglich, dass die Abweichung von 1,0 real ist, so dass neben Kohlehydrate in kleiner Menge auch andere Substanzen oxydiert werden oder dass die Verbrennung nicht vollständig zu Kohlensäure und Wasser verlauft. Der Vergleich von Sauerstoffverbrauch und Kohlehydratumsatz abgeschnittener Appendix-Stücke ergibt, dass die Atmung zwar annähernd, doch nicht vollständig durch den Kohlehydratverbrauch gedeckt wird. Durchschnittlich war der Defizit 10%.

Gleich nach dem Erwärmungsmaximum sinkt der Atmungsquotient. Der Bruchteil, den die Kohlehydratverbrennung jetzt von der ganzen Atmung ausmacht, ist viel geringer (etwa 30%).

Im engen Zusammenhang mit diesen Beobachtungen steht der Nachweis, dass im ersten Teil des Prozesses die Intensität der Atmung nicht durch Zusatz von Verbrennungssubstanzen erhöht werden kann, während sie im zweiten Teil stark gesteigert wird. Das Ergebnis ist jedoch von den äusseren Bedingungen abhängig: bei verzögerter Blütenentwicklung durch Temperaturerniedrigung kann das Atmungsferment schon beim Öffnen der Kolbens ungesättigt sein.

Das Bild der Atmungsvorgänge wird vervollständigt durch die Aufnahme der Kohlehydratbilanz. Während sich im zentralen Gewebe viel Glucose befindet und keine Maltose oder Stärke,

liegen in der peripheren Schicht hauptsächlich Saccharose, Maltose und viel Stärke vor. Ihre Mengen nehmen vor der Erwärmung zu, um beim Eintritt des Prozesses plötzlich zu verringern. Die Kohlehydratabnahme des Rindengewebes ist dem Atmungsprozess zuzuschreiben. Diese Erklärung trifft für das Markgewebe nicht zu: weitaus der grösste Teil seiner Glucose verschwindet durch eine Stoffwanderung in die periphere Schicht. Wahrscheinlich werden dem gelben Gewebe ausserdem noch Kohlehydrate aus der Knolle zugeführt.

Ich möchte die Differenz in der Kohlehydrat-Zusammensetzung der beiden Gewebeschichten so erklären, dass der zentrale Teil die Transport-Kohlehydrate enthält, die in der Aussenschicht als Di- und Polysacchariden angehäuft werden.

Die Frage, welche Substanzen am Ende der Blütenzeit ausser den Kohlehydraten veratmet werden, wurde nicht eingehend untersucht. Wahrscheinlich tritt dann eine Eiweissveratmung ein.

Wir haben gesehen, dass der Atmungsanstieg weder auf eine geänderte Sauerstoffversorgung, noch auf eine grössere Nährstoffzufuhr beruht. Er wird lediglich durch eine Aktivitätsänderung der Atmungsfermente bedingt. Beim Atmungsabfall konstatieren wir ein Defizit an Verbrennungssubstanzen. Jedoch ist das nicht die einzige Ursache: die Fermentaktivität hat sich auch stark verringert. Ein Vergleich der Atmungswerte, nach Sättigung der Fermente während und nach der Erwärmung, erwies diese Tatsache.

In einigen Versuchen wurde die Atmungserniedrigung in erster Linie nicht von einem Nährstoffmangel, doch von dem Aktivitätsverlust der Fermente verursacht.

Man dringt einen Schritt weiter in das Wesen der Atmungsreaktionen ein durch das Studium der Vorgänge, die im zerkleinerten Gewebe vor sich gehen. Der Stoffwechsel, besonders in quantitativer Richtung, ist zwar gegenüber dem lebenden Organ verändert; der Sauerstoffverbrauch ist z.B. um etwa 10—20% erniedrigt und nimmt zuerst langsam, später rascher, ab. Andererseits sind die wesentlichen Gesetzmässigkeiten (die schwache Hemmung der Oxydation durch Blausäure, die Sättigung der Fermente und die Grösse des respiratorischen Quotienten) auch im zerriebenen Gewebe unverändert geblieben; ausserdem sind die einzelnen chemischen Vorgänge hier weitgehender zu beeinflussen und von einander zu trennen als im intakten Organ. Das führt uns zum letzten Schritt: die Isolierung der vorhandenen Fermentsysteme.

Die Untersuchung der chemischen Vorgänge im zerriebenen

Gewebe hat zu der wichtigen Feststellung geführt, dass wir einen Teil der Atmungsenzyme in zwei Komponenten zerlegen können: die eine hat einen Enzymcharakter und die andere gehört zur Gruppe der Co-Fermente, da sie wasserlöslich, dialysabel und kochbeständig ist.

Sowohl Co-Zymase, wie Warburgsches Co-Ferment sind vorhanden. Die Identität der Sauromatum-Co-Zymase mit der aus Hefe und der Sauromatum-Co-Dehydrase II mit der aus roten Blutzellen, ist natürlich nicht sicher festzustellen, da sie nicht rein isoliert wurden. Sie wirken aber in gleicher Weise auf die Alkoholdehydrase, Apozymase und Hexosemonophosphorsäuredehydrase ein; ihre Identität ist daher mindestens wahrscheinlich.

Die Co-Zymase konnte durch Fällung mit Quecksilber-, salzen, Phosphorwolframsäure und Silbernitrat gereinigt werden, bei welcher ihr Reinheitsgrad von ACo 140 bis 5100 gesteigert wurde. Eine weitergehende Reinigung konnte wegen zu geringen Materialmengen noch nicht vorgenommen werden.

Im Sauromatumextrakt befindet sich eine Substanz, die die Wirkung der Co-Dehydrase II hemmt. Der Saft der ausgeblühten Kolben vermindert auch die Co-Zymase-Wirkung.

Der durch Acetonfällung und Dialyse unwirksam gewordene Appendix-Rückstand wird durch Zusatz Co-Fermenthaltiger Lösungen reaktiviert. Da der Rückstand von löslichen oxydierbaren Substanzen frei war, müssten wir noch Hexosemonophosphorsäure, Hexosediphosphorsäure oder Alkohol hinzufügen. Allerdings wurde die Aktivität durch die Vorbehandlung verringert; die Reaktivierung ist unvollständig. Eine Co-Zymaselösung aktiviert das Enzym nur teilweise; die Fermentwirkung wird erst durch Co-Zymase und Co-Dehydrase II ergänzt.

Ausser den genannten Substanzen dehydriert das Enzympräparat, mit Methylenblau als Wasserstoffacceptor, noch: Neubergester, Essigsäure, Milchsäure und Acetaldehyd, sei es auch in weitaus geringerem Masse. Im zuersterwähnten Fall ist Co-Dehydrase II der Aktivator; bei den anderen Reaktionen ist Co-Zymase erforderlich.

Eine Zerlegung des Enzymkomplexes in der Robisonester-Hexosediphosphorsäure- und der Alkoholdehydrase ist möglich. Sie brauchen die Mitarbeit des Flavinenzyms und eines Co-Fermentes (die zuersterwähnte braucht Co-Dehydrase II, die anderen dagegen Co-Zymase). Die Dehydrasen unterscheiden sich nicht von den aus anderem Ausgangsmaterial isolierten Enzymen.

Der Appendix enthält relativ grosse Mengen Flavinenzym.

Vor und während der Wärmebildung ist es etwa 94%, danach 30—60% des Gesamtflavins. Pro gr. Frischgewicht der peripheren Gewebeschicht befindet sich ± 8 γ Flavin; der zentrale Teil enthält sehr geringe Mengen.

Während der Entwicklung nehmen die Mengen Co-Zymase und Flavinenzym zu, um kurze Zeit nach der Erwärmung wieder abzunehmen. Die Atmung des zerriebenen Gewebes ändert sich nicht nach Zusatz des Flavinenzyms oder eines der Co-Fermente. Sie bedingen also die Oxydationsgeschwindigkeit nicht.

Der direkte Beweis, dass die isolierten Dehydrasen an dem normalen Atmungsprozess der Kolben beteiligt sind, konnte noch nicht erbracht werden. Indessen gewinnt diese Vorstellung durch die folgende Betrachtung an Wahrscheinlichkeit.

Auf die ausgesprochene Parallelität zwischen der Aktivität der Dehydrasen und dem Atmungsverlauf wurde schon hingewiesen. Die Enzyme befinden sich in den Teilen der Kolben, welche die intensive Verbrennung zeigen und ihre Aktivität ist nur dann gross, wenn die Sauerstoffaufnahme stark gesteigert ist. Ebenfalls zeigte ich, dass sie einen wichtigen Teil des Sauerstoffverbrauchs des Gewebes hervorrufen können: obschon bei der Isolierung der Fermente und Abtrennung der Co-Fermente ein Enzymverlust nicht zu verhindern ist, überträgt das isolierte System $^1/_5$ der Sauerstoffmenge, die bei der grössten Atmungsgeschwindigkeit aufgenommen wird. Das gelbe Oxydationsferment, das an den Dehydrierungsreaktionen beteiligt ist, befindet sich in den Appendixzellen —, vor der Atmungserhöhung —, in so grossen Mengen, dass es allen Atmungssauerstoff allein übertragen kann. Während der Periode der Erwärmung kann es $^1/_2$—$^1/_3$ Teil des Atmungssauerstoffs übertragen. Weiter fehlt das schwermetallhaltige Oxydationsferment.

Auch möchte ich noch auf folgendes hinweisen. In intensiv atmenden Zellen finden meistens neben der Atmung noch andere Prozesse (Wachstum, u.a.) statt. Unter diesen Bedingungen kann die Untersuchung der Atmungsenzyme keine eindeutige Resultate liefern. Es bleibt dann immer schwer zu entscheiden, welches Enzym an den Atmungsprozess selbst und welches an die daneben bestehenden Stoffwechselprozesse beteiligt sind. Solcher Zweifel besteht beim Sauromatum nicht!

Die Untersuchung lässt viele wichtige Fragen unbeantwortet. So müssen noch andere oxydierende Fermente an den Verbrennungsreaktionen teilnehmen, über deren Wirkung jedoch nichts bekannt ist. Auch die bei der Atmung gebildeten Zwischenprodukte wurden nicht untersucht. Vor allem wurde die Haupt-

frage noch nicht erklärt: weshalb die Atmung im erwachsenen Organ plötzlich so stark zunimmt. Denn die untersuchten Dehydrasesysteme sind schon vor dieser Atmungserhöhung in aktiver Form vorhanden. Die Beantwortung dieser Frage würde uns einen tieferen Einblick im Verlauf der Atmungsprozesse geben.

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Die Intensität der Atmung ist im erwachsenen Appendix von Sauromatum anfangs gering; plötzlich steigt sie zu einem extrem hohen Wert an (Q_{O_2} = 20—68) und nimmt dan wieder ab. Diese Erscheinung ist nur in der peripheren Gewebeschicht nachweisbar. Die Atmungssteigerung beruht auf eine Aktivitätszunahme der Atmungsfermente, während die Erniedrigung einem Defizit an Verbrennungsmaterial und einer Fermentinaktivierung zuzuschreiben ist.

2. Das Markgewebe enthält Glukose und keine Maltose und Stärke; in den Zellen der peripheren Schicht befinden sich Saccharose, Maltose und Stärke. Die Glukosemenge des zentralen Gewebes nimmt während der Erwärmung ab. Diese Abnahme wird nur teilweise von der Atmung hervorgerufen; sie ist auf eine Stoffwanderung zurückzuführen.

3. Beim Atmungsprozess des Rindengewebes werden Kohlehydrate verbrannt. Vor und während der Entfaltung der Blüten ist der respiratorische Quotient ungefähr 1 und verschwindet eine dem Sauerstoffverbrauch nahezu aequivalente Kohlehydratmenge; die Atmungsfermente sind gesättigt. Später nimmt der respiratorische Quotient ab und wird nur 30—60 Prozent der Sauerstoffaufnahme von der Kohlehydratabnahme gedeckt; die Fermente sind ungesättigt.

4. Co-Zymase und Co-Dehydrase II sind in grossen Mengen vorhanden. Die Co-Zymase-Konzentration ist nicht konstant; vor der Blütenentfaltung nimmt sie zu; später wieder ab.

5. Pro gr. Trockensubstanz befindet sich im Gewebe etwa 50—70 γ Flavin. Vor und während der grossen Aktivität der Atmungsfermente liegt mindestens 94% ihrer Menge als gelbes Ferment vor; später hat sich dieser Wert stark verringert. Die

Kurven der Flavinenzymmenge und der Atmungsgrösse zeigen einen ähnlichen Verlauf.

6. Aus der gelben Gewebeschicht kann man eine Hexosemonophosphorsäuredehydrase (= Zwischenferment), eine Hexosediphosphorsäuredehydrase und eine Alkoholdehydrase isolieren. Die zuerstgenannte Dehydrase wird von der Co-Dehydrase II aktiviert; die zweite vom Warburgschen Co-Ferment und von der Co-Zymase, während die dritte nur die Mitarbeit der Co-Zymase braucht. Ohne Flavinenzym sind sie unwirksam.

7. Ein Enzympräparat wurde isoliert, welches mehrere Fermentwirkungen zeigt. Mit Co-Zymase als Aktivator dehydriert es: Acetaldehyd, Milchsäure und Essigsäure; mit Co-Dehydrase II: den Neuberg-ester. Es zeigt keinen nachweisbaren Umsatz von Ameisensäure, Bernsteinsäure, Citronensäure, Glukose und Glykokoll.

8. Einige der isolierten Dehydrasen und das Flavinenzym sind an den normalen Atmungsprozessen der Sauromatum-Kolben beteiligt:

a. es besteht eine ausgesprochene Parallelität zwischen der Aktivität der Dehydrasen und dem Atmungsverlauf;

b. die Enzymsysteme befinden sich nur in den Teilen der Kolben, welche die intensive Verbrennung zeigen;

c. aus dem Gewebe isoliert, übertragen die Enzyme $^1/_5$ der Sauerstoffmenge, die bei der grössten Atmungsgeschwindigkeit aufgenommen wird;

d. Cytochrom und Phenolasen fehlen im Gewebe;

e. vor der sehr starken Atmung ist eine so grosse Flavinenzymmenge vorhanden, dass sie allen Atmungssauerstoff übertragen könnte; während der Periode der maximalen Atmungsgeschwindigkeit ist die Wechselzahl etwa 100—165; das gelbe Ferment könnte also $^1/_2$—$^1/_3$ Teil des Atmungssauerstoffs übertragen.

LITERATURVERZEICHNIS.

1. **E. Adler** u. **H. v. Euler**, Z. physiol. Ch. 225, 41, 1934. — 2. ——, Z. physiol. Ch. 226, 195. 1934. — 3. ——, Z. physiol. Ch. 232, 6, 1935. — 4. **E. Adler** u. **M. Michaelis**, Z. physiol. Ch. 235, 154, 1935. — 5. ——, Z. physiol. Ch. 238, 261, 1936. — 6. **W. Albach**, Protoplasma, 7, 395, 1929. — 7. **H. L. Alt**, Bio. Ztschr. 221, 498, 1930. — 8. **B. Andersson**, Z. physiol. Ch. 217, 186, 1933. — 9. ——, Z. physiol. Ch. 225, 57, 1934. —

10. **R. Bierich** u. **A. Lang**, Z. physiol. Ch. 223, 180, 1934. —

11. **F. H. Cohen**, Rec. des Trav. Chim. 54, 133, 1935. —

12. **N. Das**, Z. physiol. Ch. 238, 269, 1936. —

13. **J. Eriksson**, Unt. bot. Inst. Tüb. 1, 105, 1881—1885. — 14. **H. v. Euler**, Ergebn. d. Enzymf. 3, 135, 1934. — 15. **H. v. Euler** u. **E. Adler**, Ark. f. Kemi, Min och Geol. 11B, no 21, 1933. — 16. ——, Z. physiol. Ch. 223, 105, 1934. — 17. ——, Ark. f. Kemi, Min. och Geol. 11B, no. 28, 1934. — 18. ——, Z. physiol. Ch. 226, 195, 1934. — 19. ——, Z. physiol. Ch. 228, 1, 1934. — 20. ——, Z. physiol. Ch. 232, 10, 1935. — 21. ——, Z. physiol. Ch. 235, 164, 1935. — 22. ——, Z. physiol. Ch. 238, 233, 1936. — 23. **H. v. Euler**, **E. Adler** u. **G. Dahlgren**, Z. physiol. Ch. 236, 119, 1935. — 24. **H. v. Euler**, **E. Adler**, **F. Schlenk** u. **G. Günther**, Ark. f. Kemi, Min. och Geol. 11B, no. 52, 1935. — 25. ——, Z. physiol. Ch. 233, 120, 1935. — 26. **H. v. Euler**, **E. Adler** u. **A. Schlötzer**, Z. physiol. Ch. 226, 87, 1934. — 27. **H. v. Euler**, **H. Albers** u. **F. Schlenk**, Z. physiol. Ch. 234, 1935. — 28. ——, Z. physiol. Ch. 237, I, 1935. — 29. **H. v. Euler** u. **O. Dahl**, Biochem. Z. 282, 235, 1935. — 30. **H. v. Euler** u. **G. Günther**, Ark. f. Kemi, Min. och Geol. 11B, no. 50, 1935. — 31. ——, Z. physiol. Ch. 237, 221, 1935. — 32. ——, Z. physiol. Ch. 239, 83, 1936. — 33. **H. v. Euler**, **P. Karrer**, **M. Malmberg**, **K. Schöpp**, **F. Benz**, **B. Becker** u. **P. Frei**, Helv. Chim. Acta. 18, 522, 1935. — 34. **H. v. Euler** u. **E. Klussmann**, Naturwiss. 22, 777, 1934. — 35. **H. v. Euler** u. **K. Myrbäck**, Z. physiol. Ch. 131, 180, 1923. — 36. ——, Z. physiol. Ch. 181, 1, 1929. — 37. **H. v. Euler** u. **R. Nilsson**, Bioch. J. 25, 2168, 1934. — 38. **H. v. Euler** u. **Sv. Steffenburg**, Z. physiol. Ch. 175, 38, 1928. — 39. **H. v. Euler** u. **R. Vestin**, Z. physiol. Ch. 237, 1, 1935. —

40. **M. Garreau**, Ann. d. Sci. Nat. III, 16, 250, 1851. —

41. **E. Haas**, Naturwiss. 22, 207, 1934. — 42. **M. Hahn**, Ber. d. D. Chem. Ges. 33, 3555, 1900. — 43. **I. M. Heilbron**, **E. G. Parry** u. **R. F. Phipers**, Bioch. J. 29, 1382, 1935. — 44. **A. W. H. v. Herk**, Arch. Néerl. Physiol. 18, 578, 1933. — 45. ——, Ark. f. Kemi, Min. och Geol. 11A, no. 22, 1935. — 46. **A. W. H. v. Herk** u. **N. P. Badenhuizen**, Proc. Kon. Akad. Amsterdam, 37, 99, 1934. —

47. **P. Karrer**, **B. Becker**, **F. Benz**, **P. Frei**, **H. Salomon** u. **K. Schöpp**, Helv. Chim. Acta. 18, 1435, 1935. — 48. **P. Karrer**, **H. v. Euler** u. **K. Schöpp**, Ark. f. Kemi, Min. och Geol. 11B, no. 54, 1935. — 49. **P. Karrer** u. **H. Fritzsche**, Helv. Chim. Acta. 18, 911, 1935. — 50. **P. Karrer**, **T. Köbner**, **H. Salomon** u. **F. Zehender**, Helv. Chim. Acta. 18, 266, 1935. — 51. **P. Karrer**, **H. Salomon** u. **K. Schöpp**, Helv. Chim. Acta. 18, 1143, 1935. — 52. **P. Karrer**, **H. Salomon**, **K. Schöpp**, **F. Benz** u. **B. Becker**, Helv. Chim. Acta. 18, 908, 1935. — 53. **P. Karrer**, **H. Salomon**, **K. Schöpp**, **E. Schlittler** u. **H. Fritzsche**, Helv. Chim. Acta. 17, 1010, 1934. — 54. **P. Karrer**, **K. Schöpp**, Helv. Chim. Acta. 17, 735, 1935. — 55. ——, Helv. Chim. Acta. 17, 771, 1934. — 56. ——, Helv. Chim. Acta. 17. 1013, 1934. — 57. **P. Karrer**, **K. Schöpp** u. **F. Benz**, Helv. Chim. Acta. 18, 426, 1935. — 58. **P. Karrer** u. **F. M. Strong**, Helv. Chim. Acta. 18, 1343, 1935. — 59. **D. Keilin**, Proc. Roy. Soc.

London. **106**, 418, 1930. — 60. ——, Ergebn. d. Enzymf. **2**, 239, 1933. — 61. **E. Knoch**, Bibl. Bot. H. **47**, 1899. — 62. **W. Koschara**, Ber. D. Chem. Ges. **67**, 761, 1934. — 63. **G. Kraus**, Abh. Naturf. Ges. Halle. **16**, 35, 1886. — 64. ——, Abh. Naturf. Ges. Halle. **16**, 257, 1886. — 65. ——, Ann. Buitenzorg **13**, 217, 1896. — 66. **R. Kuhn, P. Györgyi** u. **Th. Wagner-Jauregg**, Ber. D. Chem. Ges. **66**, 1034, 193. — 67. **R. Kuhn** u. **H. Kaltschmitt**, Ber. D. Chem. Ges. **68**, 128, 1935. — 68. ——, Ber. D. Chem. Ges. **68**, 386, 1935. — 69. **R. Kuhn** u. **G. Moruzzi**, Ber. D. Chem. Ges. **67**, 888, 1934. — 70. ——, Ber. D. Chem. Ges. **67**, 1220, 1934. — 71. **R. Kuhn** u. **K. Reinemund**, Ber. D. Chem. Ges. **67**, 1932, 1934. — 72. **R. Kuhn** u. **H. Rudy**, Ber. D. Chem. Ges. **68**, 383, 1935. — 73. ——, Z. physiol. Ch. **239**, 47, 1936. — 74. **R. Kuhn, H. Rudy** u. **K. Reinemund**, Ber. D. Chem. Ges. **68**, 170, 1935. — 75. **R. Kuhn** u. **Th. Wagner-Jauregg**, Ber. D. Chem. Ges. **67**, 1770, 1934. — 76. **R. Kuhn, Th. Wagner-Jauregg** u. **H. Kaltschmitt**, Ber. D. Chem. Ges. **67**, 1452, 1934. — 77. **R. Kuhn** u. **F. Weygand**, Ber. D. Chem. Ges. **67**, 1939, 1934. — 78. ——, Ber. D. Chem. Ges. **67**, 2084, 1934. — 79. ——, Ber. D. Chem. Ges. **68**, 1001, 1935. —

80. **E. Laser**, Biochem. Z. **268**, 451, 1934. — 81. **O. Lehmann**, Planta **13**, 575, 1931. — 82. **E. Leick**, Mitt. Naturw. Verein Neu-Vorpommern und Rügen. **45**, 159, 1913. — 83. ——, Ber. D. Bot. Ges. **33**, 528, 1915. — 84. ——, Mitt. Naturw. Verein Neu-Vorpommern und Rügen **48—49**, 55, 1920—1921. —

85. **K. Myrbäck**, Ergebn. d. Enzymf. **2**, 139, 1933. — 86. ——, Z. physiol. Ch. **217**, 249, 1933. — 87. ——, Z. physiol. Ch. **225**, 199, 1934. — 88. ——, Z. physiol. Ch. **233**, 95, 1935. — 89. ——, Z. physiol. Ch. **233**, 154, 1935. — 90. ——, Z. physiol. Ch. **234**, 259, 1935. — 91. **K. Myrbäck** u. **H. v. Euler**, Z. physiol. Ch. **176**, 258, 1928. — 92. **K. Myrbäck** u. **H. Larsson**, Z. physiol. Ch. **225**, 131, 1934. — 93. **K. Myrbäck** u. **B. Ortenblad**, Z. physiol. Ch. **233**, 87, 1935. — 94. ——, Z. physiol. Ch. **233**, 148, 1935. — 95. ——, Z. physiol. Ch. **234**, 254, 1935. —

96. **E. Negelein** u. **W. Gerischer**, Biochem. Z. **284**, 289, 1936. — 97. **E. Negelein** u. **E. Haas**, Biochem. Z. **282**, 206, 1935. —

98. **F. J. Ogston** u. **D. E. Green**, Biochem. J. **29**, 1983, 1935. — 99. ——, Biochem. J. **29**, 2005, 1935. —

100. **L. B. Pett**, Ark. f. Kemi, Min. och Geol. **11B**, no. 53, 1935. — 101. ——, Biochem. J. **29**, 937, 1935. —

102. **G. Rodio**, Bullet. dell' orto Bot. Univ. Napoli **11**, 145, 1932. — 103. **J. Runnström**, Protoplasma **10**, 106, 1930. — 104. **H. Rudy**, Naturwiss. **23**, 286, 1935. —

105. **C. B. Sanders**, Rep. 76-th meeting Brit. Assoc. Advanc. Science. York. 739, 1906. — 106. **F. Schlenk** u. **H. v. Euler**, Naturwiss. **24**, 794, 1936. — 107. **Th. Schmucker**, Flora, **18—19**, 460, 1925. — 108. **K. Shibata** u. **H. Tamiya**, Acta Phytochim. **7**, 191, 1933. — 109. **K. G. Stern**, Biochem. J. **28**, 949, 1934. — 110. **K. G. Stern** u. **E. R. Holiday**, Ber. D. Chem. Ges. **67**, 1442, 1934. — 111. **A. Stoll**, Naturwiss. **24**, 53, 1936. — 112. **H. Sutter**, Ergebn. d. Enzymf. **5**, 273, 1936. — 113. **A. Szent-Györgyi** u. **K. Vietorisz**, Biochem. Z. **233**, 236, 1931. —

114. **H. Theorell**, Biochem. Z. **272**, 155, 1934. — 115. ——, Biochem. Z. **275**, 11, 1935. — 116. ——, Biochem. Z. **275**, 19, 1935. — 117. ——, Biochem. Z. **275**, 30, 1935. — 118. ——, Biochem. Z. **275**, 37, 1935. — 119. ——, Biochem. Z. **275**, 344, 1935. — 120. ——, Biochem. Z. **275**, 416, 1935. — 121. ——, Biochem. Z. **278**, 263, 1935. — 122. ——, Biochem. Z. **279**, 186, 1935. — 123. **H. Theorell, P. Karrer, K. Schöpp** u. **P. Frei**, Helv. Chim. Acta. **18**, 1022, 1935. — 124. **D. Tollenaar**, Omzettingen van koolhydraten in het blad van Nicotiana Tabacum. Diss. Wageningen. 1925. —

125. **Th. Wagner-Jauregg**, Ergebn. d. Enzymf. **4**, 333, 1935. — 126. **Th. Wagner-Jauregg** u. **E. F. Möller**, Z. physiol. Ch. **236**, 216, 1935. — 127. **Th. Wagner-Jauregg, E. F. Möller** u. **H. Rauen**, Z. physiol. Ch. **231**, 55, 1935. — 128. **Th. Wagner-Jauregg** u. **H. Rauen**, Z. physiol. Ch. **233**, 215, 1935. — 129. ——, Z. physiol. Ch. **237**, 227, 1935. — 130. ——, Z. physiol. Ch. **237**, 233, 1935. — 131. **Th. Wagner-Jauregg, H. Rauen** u. **E. F. Möller**, Z. physiol. Ch. **228**, 273, 1934. — 132. **Th. Wagner-Jauregg** u. **H. Ruska**, Ber. D. Chem. Ges. **66**, 1298, 1933. — 133. **O. Warburg**, Z. physiol. Ch. **57**, 1, 1908. — 134. ——, Z. physiol. Ch. **92**, 231, 1914. — 135. **O. Warburg** u. **W. Christian**, Biochem. Z. **242**, 206, 1931. — 136. ——, Biochem. Z. **254**, 438, 1932. — 137. ——, Biochem. Z. **257**, 492, 1933. — 138. ——, Biochem. Z. **258**, 496, 1933. — 139. ——, Biochem. Z. **260**, 499, 1933. — 140. ——, Biochem. Z. **263**, 228, 1933. — 141. ——, Biochem. Z. **266**, 377, 1933. — 142. ——, Biochem. Z. **274**, 112, 1934. — 143. ——, Biochem. Z. **275**, 112, 1935. — 144. ——, Biochem. Z. **275**, 464, 1935. — 145. ——, Biochem. Z. **282**, 221, 1935. — 146. **O. Warburg, W. Christian** u. **A. Griese**, Biochem. Z. **279**, 143, 1935. — 147. ——, Biochem. Z. **282**, 157, 1935. — 148. **O. Warburg, E. Negelein** u. **E. Haas**, Biochem. Z. **266**, 1, 1933. — 149. **Th. Weevers**, Versl. Kon. Akad. Amsterdam. 206, 1911.